DER MECHANISMUS DER HAMAMELOSE–BIOSYNTHESE: IN VIVO UNTERSUCHUNGEN MIT BLÄTTERN VON PRIMULA CLUSIANA TAUSCH

Hans Gilck

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0019

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

DER MECHANISMUS DER HAMAMELOSE - BIOSYNTHESE: IN VIVO UNTERSUCHUNGEN MIT BLÄTTERN VON PRIMULA CLUSIANA TAUSCH

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Hans Gilck
aus
Söcking

Juni 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Beck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 13.7.1972

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG und AUFGABENSTELLUNG 1

2. MATERIAL und METHODEN 4
2.1. Radioaktivitätsmessung 4
2.1.1. Messung von ^{14}C mit dem Proportionalitätszählrohr 4
2.1.2. Messung von Tritium und ^{14}C im Flüssigkeits-szintillationsspektrometer 4
2.1.2.1. Meßgerät 4
2.1.2.2. Zählflüssigkeit 4
2.1.2.3. Messung und Auswertung 5
2.1.2.4. Fehlerbetrachtung 8
2.2. Pflanzenmaterial 11
2.3. Applikation der radioaktiven Substanzen 11
2.3.1. Tritium und ^{14}C-doppeltmarkierte Glucosen 11
2.3.2. $^{14}CO_2$ 13
2.4. Extraktion und Fraktionierung 13
2.5. Chromatographische Auftrennung der Extrakte und Identifizierung der radioaktiven Substanzen 13
2.6. Isolierung von Zuckerphosphaten und -nukleotiden 14
2.7. Isolierung von radioaktiver Hamamelose, Saccharose und Glucose aus der Saccharose 15
2.8. Isolierung von kristalliner nicht radioaktiver Hamamelose 15
2.9. Bestimmung der Tritium-Einbauraten in Hamamelose, Saccharose, Glucose(S) und Fructose(S) 16
2.10. Abbau der Hamamelose 18
2.10.1. Darstellung, Identifizierung und Charakterisierung von Kaliumhamamelonat 19
2.10.2. Perjodatspaltung von Kaliumhamamelonat 22
2.10.3. Isolierung von Formaldehyd 22
2.10.4. Isolierung von Ameisensäure 23
2.10.5. Isolierung von Oxalsäure 23
2.10.6. Untersuchungen zu möglichen Tritium-Isotopeneffekten bei dem Abbau von Hamamelose 23
2.10.6.1. Prüfung auf Isotopeneffekte bei der Umkristallisation von Hamamelose 23

Seite

2.10.6.2. Prüfung auf Isotopeneffekte bei der Oxidation von Hamamelose zu Hamamelonsäure 24
2.10.6.3. Prüfung auf Isotopeneffekte bei der Perjodatspaltung und der Isolierung von Formaldehyd 25
2.10.6.4. Prüfung auf Isotopeneffekte bei der Isolierung von Ameisensäure 27
2.10.7. Auswertung der Abbauergebnisse 28
2.11. Abbau der Glucose 29
2.11.1. Eigene Modifikationen des Abbaus nach Simon et al. (39-41) 29
2.11.2. Auswertung der Abbauergebnisse 31

3. VERSUCHSERGEBNISSE 33
3.1. Untersuchungen über das Auftreten von Zwischenprodukten der Hamamelosesynthese in Primula clusiana 33
3.1.1. Nachweis von Hamamelosediphosphat und -monophosphat 33
3.1.2. Kinetik der Markierung von HDP, HMP und freier Hamamelose (mit Hamamelit) bei Photosynthese in $^{14}CO_2$-haltiger Luft 34
3.2. Einbau von Tritium in Hamamelose aus positionsmarkierter Glucose 38
3.3. Die Tritiumverteilung innerhalb des Hamamelose- und Glucosemoleküls 45

4. DISKUSSION 57
4.1. Kondensation freier Triosen oder Umlagerung einer geradkettigen Hexose bei der Hamamelose-Biosynthese 57
4.2. Der Mechanismus der intramolekularen Umlagerung 59
4.2.1. FDP als Ausgangssubstanz der Umlagerung 59
4.2.2. 5-Keto-FDP als Zwischenprodukt 60
4.2.3. Spaltung des 5-Keto-FDP 61
4.2.4. Kondensation der enzymgebundenen Spalthälften zu 4-Keto-HDP, Reduktion zu HDP und Dephosphorylierung zu freier Hamamelose 64

Seite

5. ZUSAMMENFASSUNG 67

6. LITERATURVERZEICHNIS 71

In der vorliegenden Arbeit werden folgende allgemeine Abkürzungen verwendet:

GPI	=	Glucosephosphat-Isomerase (E.C.5.3.1.9.)
HK	=	Hexokinase (E.C.2.7.1.1.)
PFK	=	Phosphofructokinase (E.C.2.7.1.11.)
TIM	=	Triosephosphat-Isomerase (E.C.5.3.1.1.)
DHAP	=	Dihydroxyacetonphosphat
FDP	=	Fructose-1,6-diphosphat
FMP	=	Fructosemonophosphat
F-6-P	=	Fructose-6-phosphat
GAP	=	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GDP	=	Glucose-1,6-diphosphat
GMP	=	Glucosemonophosphat
G-1-P	=	Glucose-1-phosphat
G-6-P	=	Glucose-6-phosphat
HDP	=	Hamamelosediphosphat
HMP	=	Hamamelosemonophosphat
NAD	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
RuDP	=	Ribulose-1,5-diphosphat
SDP	=	Sedoheptulose-1,7-diphosphat
SMP	=	Sedoheptulosemonophosphat
UDP	=	Uridin-5'-diphosphat
Fructose(S)	=	Fructose aus der Saccharose
Glucose(S)	=	Glucose aus der Saccharose
cpm	=	Impulsrate
dpm	=	Zerfallsrate

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Neben den Monosacchariden mit geradkettigem Kohlenstoffskelett kommen in höheren Pflanzen zwei Zucker mit verzweigtem Kohlenstoffgerüst vor, nämlich D-Apiose (3-C-Hydroxymethyl-D-Erythrose) und D-Hamamelose (2-C-Hydroxymethyl-D-Ribose). Während die Apiosebiosynthese vom Mechanismus und von der Enzymatik her weitgehend bekannt ist (1-4), liegen über die Biosynthese der Hamamelose noch recht wenige Arbeiten vor.

Eickenbusch et al. (5) zeigten in vivo an Blättern von Primula clusiana, daß Hamamelose ein Metabolit des photosynthetischen Kohlenhydratstoffwechsels ist und vermutlich in den Chloroplasten gebildet wird. Beck et al. (6) konnten nachweisen, daß Hamamelose bei Belichtung der Blätter nicht nur aus CO_2 sondern auch aus exogener Glucose gebildet werden kann. Durch Fütterung positions-^{14}C-markierter Glucosen konnte gezeigt werden, daß alle Kohlenstoffatome der applizierten Glucosen in etwa gleichem Umfang in Hamamelose eingebaut werden. Aus den gefundenen biogenetischen Beziehungen zwischen den einzelnen Kohlenstoffatomen von Glucose und Hamamelose wurde der Schluß gezogen, daß Hamamelose (wie auch Apiose und Streptose) durch intramolekulare Umlagerung aus einem unverzweigtkettigen Monosaccharid entsteht.

Ein Einbau sämtlicher Kohlenstoffatome der Glucose in Hamamelose ist jedoch auch zu erwarten, wenn Glucose über FDP * zu Triosephosphat gespalten wird und Hamamelose durch Kondensation zweier Moleküle Triosephosphat entsteht. Diese Möglichkeit kann nur ausgeschlossen werden, wenn gezeigt wird, daß nach Applikation von positions-^{14}C-markierter Glucose nur eine 3-C-Hälfte der Hamamelose radioaktiv markiert ist. Dies konnten Beck et al. (6) in einem Fall bestätigen. Sie fanden, daß der Schwerpunkt der Radioaktivität in der Hamamelose nach Fütterung von Glucose-2-^{14}C ebenfalls am Kohlenstoffatom 2 auftritt. In allen anderen Fällen ließ entweder die Markierung der applizierten Glucose oder der Abbau der ^{14}C-Hamamelose eine entsprechende Aussage nicht zu.

---

* Abkürzungen siehe S. III

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb zunächst versucht werden, weitere Beweise für eine intramolekulare Umlagerung bei der Hamamelosebiosynthese zu sammeln. Weiterhin sollte versucht werden, durch Applikation von positions-T-markierten Glucosen im in-vivo-Experiment Aufschlüsse über den Umlagerungsmechanismus zu erhalten.

Beck et al. (6) haben ihre Daten mit einem hypothetischen Reaktionsschema erklärt, in dem die Umlagerung von einem 5-Keto-D-Fructosephosphat ausgeht. Die Existenz dieser Zwischenverbindung war in Analogie zu den Verhältnissen bei der Apiosebiosynthese postuliert worden. Dort konnte das Auftreten einer intermediär oxidierten Zwischenstufe durch den T-Transport von C-4 der UDP-Glucuronsäure nach C-3' der Apiose wahrscheinlich gemacht werden(1). Ein entsprechendes Zwischenprodukt hatten Candy et al. (7) auch bei der Biosynthese der Streptose (5-Deoxy-3-formyl-L-lyxose) postuliert.
Daher sollte versucht werden, Hinweise für das mögliche Auftreten einer 5-Keto-D-hexose bei der Biosynthese der Hamamelose zu erhalten.

Zweifellos wären prinzipiell klarere Aussagen bei Versuchen im in-vitro-System zu erwarten, da die Markierung der Ausgangsverbindung für die Umlagerung im in-vivo-System durch zahlreiche weitere in ihrem quantitativen Ablauf schwer abzuschätzende Reaktionen verändert werden kann. Da jedoch Vorversuche in isolierten Chloroplasten aus Primula clusiana wohl infolge des hohen Gehalts an Polygalakturonsäure-Schleim in diesen Blättern keine enzymatischen Aktivitäten erkennen ließen, wurde das in-vivo-System trotz der zu erwartenden Schwierigkeiten bei der Deutung der Ergebnisse vorgezogen.

Als Versuchspflanze diente wie auch in den vorhergegangenen Arbeiten über die Biosynthese der Hamamelose (5,6), Primula clusiana Tausch. Die Blätter dieser Primel enthalten, wie die der anderen Arten der Subgenus Auriculastrum, relativ große Mengen an freier Hamamelose bzw. an Hamamelit, dem entsprechenden Zuckeralkohol (8). Da die einzelnen Primelblätter die applizierte Lösung unterschiedlich gut aufnehmen und da gezeigt worden ist, daß die Hamameloseproduktion in Primula clusiana stark vom physiologischen Zustand der Blätter abhängt (9), muß das Untersuchungsmaterial in jedem Fall als

inhomogen bezeichnet werden. Um trotzdem durch repräsentative T-Einbauraten Hinweise auf den Umlagerungsmechanismus zu erhalten, wurde zur Standardisierung jeweils gleichzeitig mit der T-markierten Glucose eine ^{14}C-uniformmarkierte Glucose appliziert. Damit kann das T/^{14}C-Verhältnis als Maß für den T-Einbau herangezogen werden. Da sämtliche Kohlenstoffatome der Glucose in die Hamamelose eingebaut werden (6), kann zudem bei Fütterung einer T-positions-und ^{14}C-uniformmarkierten Glucose auch die T-Verteilung innerhalb des Hamamelosemoleküls aus dem T/^{14}C-Verhältnis der Abbauprodukte berechnet werden.

Es ist unwahrscheinlich, daß die postulierte intramolekulare Umlagerung (6) an dem freien Monosaccharid stattfindet. Schon Beck et al. (6) hatten das Vorkommen eines Hamamelosemonophosphats * erwähnt; es lag also die Annahme nahe, daß die Hamamelosebiosynthese von einem unverzweigtkettigen Monosaccharidmonophosphat ausgeht. Inzwischen haben jedoch Beck et al. (10) die Synthese von Hamamelosediphosphat in isolierten Spinatchloroplasten sowie das Auftreten von Hamamelosemonophosphat und freier Hamamelose in ganzen Spinatblättern beschrieben. Deshalb lag der Schluß nahe, daß freie Hamamelose durch schrittweise Dephosphorylierung aus Hamamelosediphosphat entsteht.

Ein Hinweis auf die Richtigkeit dieser Hyphothese wäre der Befund, daß Hamamelosediphosphat, -monophosphat und freie Hamamelose nebeneinander in Blättern vorkommen. Außerdem sollten auch die Markierungskinetiken dieser Verbindungen mit ^{14}C bei Photosynthese in $^{14}CO_2$ die biogenetische Sequenz Hamamelose-diphosphat ⟶ Hamamelosemonophosphat ⟶ Hamamelose wahrscheinlich machen. Entsprechende Versuche dazu sollten diesen Aspekt klären.

Wenn das Produkt der Umlagerung tatsächlich Hamamelosediphosphat ist, wäre die Ausgangsverbindung unter den Zuckerdiphosphaten zu suchen. Unter diesem Gesichtspunkt gewinnt die Frage, ob nicht doch eine Kondensation zweier Moleküle Triosephosphat (GAP) zum Hamamelosediphosphat führt, besonderes Gewicht.

---

* Inzwischen konnte diese Substanz als Hamamelose-5-phosphat identifiziert werden (Beck, E.: Persönliche Mitteilung)

2. Material und Methoden

2.1. Radioaktivitätsmessung

2.1.1. Messung von ^{14}C mit dem Proportionalitätszählrohr

Die Radioaktivität ^{14}C-einfachmarkierter Proben wurde mit dem Methandurchflußzählrohr FH 407A und dem Netz- und Hochspannungsteil FH 498 der Fa. Frieseke und Höepfner, Erlangen - Bruck bestimmt. Dabei wurde sowohl in unendlich dünner Schicht als auch in konstanter Schichtdicke (Auswertung der radioaktiven Papierchromatogramme) gemessen. Bei beiden Verfahren wurden die Zählausbeuten bestimmt und die Messwerte von cpm auf dpm umgerechnet.

2.1.2. Messung von Tritium und ^{14}C im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer

2.1.2.1. Meßgerät

Die Radioaktivitätsbestimmung T- und ^{14}C-doppeltmarkierter Proben wurde im Szintillationsspektrometer LS 250 der Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton (California) durchgeführt, einem Mehrkanalzähler mit logarithmisch verstärktem Energiespektrum und ^{137}Cs als externem Standard. Das Gerät wurde zusätzlich mit einem Kühlaggregat ausgerüstet, das Messungen bei konstanter Temperatur ($\pm$ 0,5°C) im Bereich von +5°C bis +20°C erlaubt.

2.1.2.2. Zählflüssigkeit

Zur Messung von Substanzen, die direkt oder nach Zugabe von Methanol als Lösungsvermittler in Toluol löslich sind, wurde ein Zähl-Cocktail folgender Zusammensetzung verwendet (11):

7 g Butyl-PBD*
1 l Toluol (Cocktail I)

Zur Messung wasserlöslicher Substanzen wurde dieser Zählflüssigkeit noch 10% Beckman-Biosolve BBS-3 (12) zugesetzt. (Cocktail II)

---

* Butyl-PBD = 2-(4'-t-Butylphenyl)-5-(4''-biphenylyl)-1,3,4-oxadiazol

2.1.2.3. Messung und Auswertung

Sämtliche Messungen wurden in Glasprobenfläschen ("Super-Glasprobenfläschchen" der Fa. Packard Instruments GmbH) mit 10 ml Zählflüssigkeit bei einer konstanten Temperatur von 7°C (13,14) durchgeführt. Die Meßproben wurden mindestens 30 min vor der Messung in den Probenraum eingestellt. Die Standardisierung erfolgte nach der Externen-Standard-Kanalverhältnis (ESKV)-Methode (15). Nach Rauschenbach und Simon (16) kann damit der Löschgrad der einzelnen Probe exakter bestimmt werden als bei interner Standardisierung. Untersuchungen derselben Autoren (17) zeigten außerdem, daß Glas als Probenfläschenmaterial genauere ESKV-Werte liefert als Nylon oder Polyäthylen.

Die Messungen erfolgten in zwei Zählkanälen, deren Kanalgrenzen speziell für die Messung T- und ^{14}C-doppeltmarkierter Proben vom Gerätehersteller festgelegt sind (18). In dem "Tritium-Kanal" war die untere Kanalgrenze mit der unteren Diskriminatorschwelle des Meßgeräts identisch, während die obere Schwelle etwa mit dem Ende des Tritiumspektrums zusammenfiel. Der "^{14}C (-über T)-Kanal" erfaßte den oberen Teil des ^{14}C-Spektrums, wobei die untere Schwelle knapp über der oberen Kanalgrenze des Tritium-Kanals lag.

Zur Ermittlung der T- und ^{14}C-Zählausbeuten in den beiden Kanälen und der zugehörigen ESKV-Werte bei unterschiedlich gelöschten Proben wurden Eichwerte für Cocktail I mit steigenden Mengen Methanol und für Cocktail II mit steigenden Mengen Wasser und internem T- bzw. ^{14}C-Toluolstandard hergestellt. Die zugesetzte Standardmenge wurde nach den von Herberg (19) angegebenen Bedingungen gewählt.

Die Gesamtverstärkung ("gain") des Meßgeräts und damit die Lage der Tritium- und ^{14}C-Spektren in den beiden Zählkanälen wurde nach den Empfehlungen des Geräteherstellers (18) so eingestellt, daß bei der am wenigsten gelöschten Probe der Spillover von Tritium in den ^{14}C(-über T)-Kanal etwa 1% beträgt. Von den ^{14}C-Eichproben wurden die ESKV-Werte bestimmt und aus den jeweils anschließend gemessenen Impulsraten in den beiden Zähl-

kanälen die ^{14}C-Zählausbeute im ^{14}C(-über T)-Kanal und der Spillover von ^{14}C in den Tritium-Kanal berechnet. Ebenso wurden die ESKV-Werte der T-Eichproben bestimmt und die T-Zählausbeute im Tritium-Kanal und der Spillover von T in den ^{14}C(-über T)-Kanal ermittelt. Die erhaltenen Löschkorrekturkurven für Cocktail I sind in Abb.1 und 2 dargestellt. Sie weichen kaum von den mit Cocktail II erhaltenen Kurven ab.

Bei der Messung einer unbekannten T- und ^{14}C-doppeltmarkierten Probe wurden die Impulsraten A und B in den beiden Zählkanälen und der ESKV-Wert bestimmt. Aus den Löschkorrekturkurven können dann mit Hilfe des ESKV-Wertes die Zählausbeuten (M und N) sowie die Spilloverwerte (m und n) graphisch ermittelt werden. Für die T- und ^{14}C-Werte gilt:

$$dpm_{^{14}C} = \frac{A - Bn}{(1 - mn)M} ;$$

$$dpm_T = \frac{B - Am}{(1 - mn)N} ;$$

A = cpm im Tritium-Kanal
B = cpm im ^{14}C(-über T)-Kanal
M = T-Zählausbeute im T-Kanal *
N = ^{14}C-Zählausbeute im ^{14}C(-über T)-Kanal *
m = T-Spillover in den ^{14}C(-über T)-Kanal *
n = ^{14}C-Spillover in den T-Kanal *

Es wurde jedoch stets noch der T/^{14}C-Wert berechnet, da hier Fehler, wie Wäge-, Pipettier- und Titrationsfehler entfallen, die bei der Bestimmung spezifischer Radioaktivitäten berücksichtigt werden müßten.
Für das T/^{14}C-Verhältnis gilt dann:

$$\frac{dpm_T}{dpm_{^{14}C}} = \frac{(A - Bn)N}{(B - Am)M} ; \quad [1]$$

---

* Werte jeweils auf 1,0 = 100% bezogen

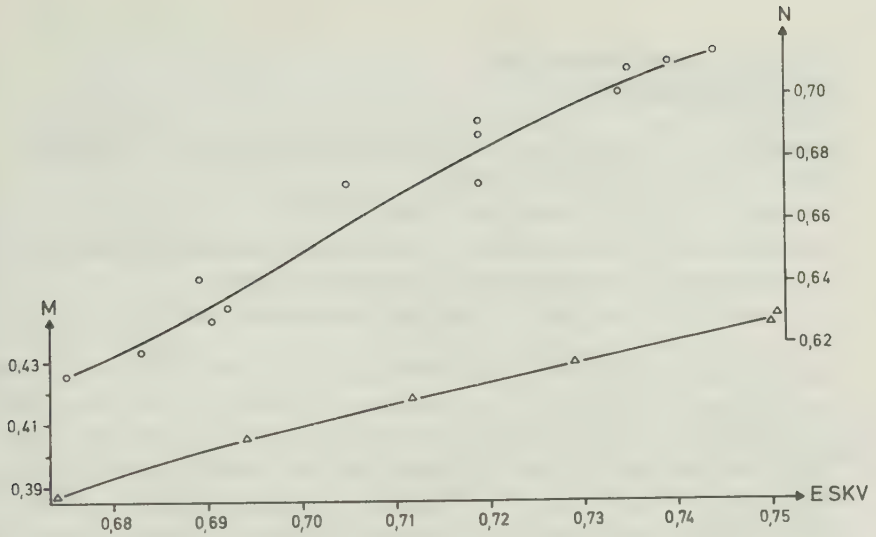


Abb. 1: Externes Standard-Kanal-Verhaltnis (ESKV) und Tritium- bzw. ^{14}C-Zählausbeute bei Methanol-Löschung in Cocktail I.
M = Tritium-Zählausbeute im Tritium-Kanal
N = ^{14}C-Zählausbeute im ^{14}C(-über T)-Kanal

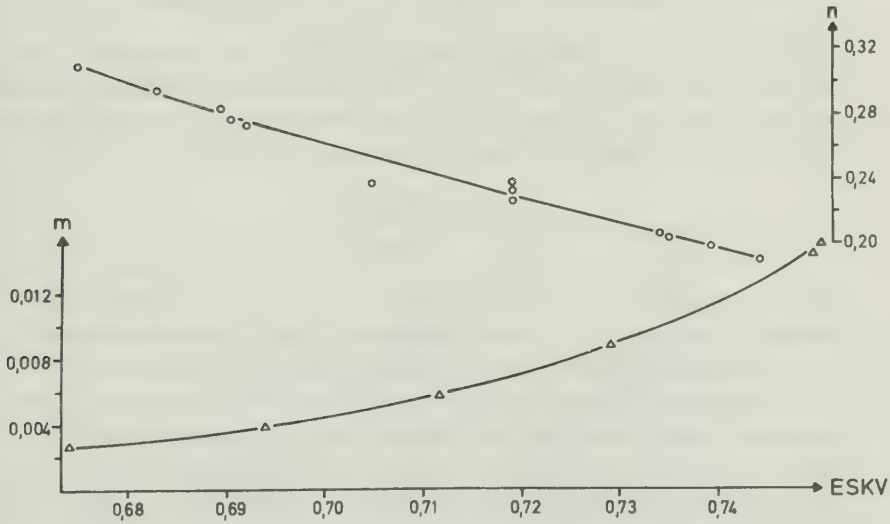


Abb. 2: Externes Standard-Kanal-Verhältnis (ESKV) und Tritium- bzw. ^{14}C-Spillover bei Methanol-Löschung in Cocktail I.
m = Tritium-Spillover in den ^{14}C(-über T)-Kanal
n = ^{14}C-Spillover in den Tritium-Kanal

2.1.2.4 Fehlerbetrachtung

A. Fehlerquellen

Folgende Fehler müssen bei der Bestimmung des $T/^{14}C$-Verhältnisses berücksichtigt werden:

a. Fehler der individuellen Probe
b. Durch den Isotopenzerfall bedingte statistische Fehler der gemessenen Impulsraten und des ESKV-Wertes
c. Fehler bei der Erstellung der Löschkorrekturkurven

zu a.) Bei den Fehlern der individuellen Probe kommt nur Phosphoreszenz in Betracht, da Wäge und Pipettierfehler durch Bestimmung des $T/^{14}C$-Verhältnisses entfallen. Eine durch Licht erzeugte Phosphoreszenz ist nach 30 min im Dunkeln abgeklungen. Chemolumineszenz konnte bei den vorliegenden Meßproben als Fehlerquelle ausgeschlossen werden; sie tritt hauptsächlich bei Zählflüssigkeiten auf Dioxanbasis auf und kann durch Probenkühlung wirkungsvoll erniedrigt werden (14).

zu b.) Für die durch die Zählstatistik bedingte Standardabweichung der gemessenen Impulsrate gilt: $\sigma = \frac{1}{\sqrt{cpm \cdot t}}$

Die Meßzeit wurde stets so gewählt, daß in dem Kanal mit der niedrigeren Impulsrate (cpm_1) die Standardabweichung höchstens gleich 0,5% war. Für die Standardabweichung σ_2 in dem anderen Kanal mit der Zählrate (cpm_2) gilt dann:

$$\sigma_2 \leqq \sigma_1 \cdot \sqrt{\frac{cpm_1}{cpm_2}} \quad ;$$

Der Fehler, der durch den Abzug der Nullrate in beiden Zählkanälen bedingt ist, wurde vernachlässigt. Die gerätespezifische Standardabweichung des ESKV wurde durch wiederholte Messungen verschiedener Proben zu 0,2% (1σ) ermittelt. Vorversuche haben gezeigt, daß dieser relativ kleine Fehler u.a. nur bei guter Temperaturkonstanz im Probenraum und der Zählkammer sowie bei einer Probenvorkühlzeit von mindestens 30 min erreicht werden kann.

zu c.) Fehler bei der Erstellung der Löschkorrekturkurven können auf Grund der zahlreichen Eichwerte praktisch vernachlässigt werden.

B. Fehlerfortpflanzung

Zur Bestimmung der Fortpflanzung des ESKV-Fehlers auf die Zählausbeuten und die Spillover-Werte wurde für jede Löschkorrekturkurve die Tangente mit dem größtmöglichen Richtungsfaktor $tg \alpha_{M(N,m,n)} = \frac{\Delta M(N,m,n)}{\Delta ESKV}$ graphisch ermittelt.
Für den absoluten Fehler $\varepsilon_M(\varepsilon_N, \varepsilon_m, \varepsilon_n)$ von M(N,m,n) gilt dann:

$$\left|\varepsilon_{M(N,m,n)}\right| \leqq \left|\frac{\Delta M(N,m,n)}{\Delta ESKV} \cdot \varepsilon_{ESKV}\right| ;$$

Da sich der Fehler des nach Gleichung [1] ermittelten $T/^{14}C$-Wertes aus den einzelnen Fehlern von A,B,M,N,m und n zusammensetzt, gilt für den absoluten Fehler $\varepsilon_{T/^{14}C}$ nach den Regeln für die Fehlerabschätzung bei Funktionen mit mehreren Veränderlichen (20,21):

$$\left|\varepsilon_{T/^{14}C}\right| \leqq \left|\frac{\partial_{T/^{14}C}}{\partial_A}\right|\left|\varepsilon_A\right| + \left|\frac{\partial_{T/^{14}C}}{\partial_B}\right|\left|\varepsilon_B\right| + \left|\frac{\partial_{T/^{14}C}}{\partial_M}\right|\left|\varepsilon_M\right| +$$

$$\left|\frac{\partial_{T/^{14}C}}{\partial_N}\right|\left|\varepsilon_N\right| + \left|\frac{\partial_{T/^{14}C}}{\partial_m}\right|\left|\varepsilon_m\right| + \left|\frac{\partial_{T/^{14}C}}{\partial_n}\right|\left|\varepsilon_n\right| :$$

Nach Bestimmung der partiellen Differentiale von Gleichung [1] ergibt sich:

$$\left|\varepsilon_{T/^{14}C}\right| \leqq \left|\frac{BN(1 - mn)}{M(B - Am)^2}\right|\left|\varepsilon_A\right| + \left|\frac{AN(1 - mn)}{M(B - Am)^2}\right|\left|\varepsilon_B\right| +$$

$$\left|\frac{N(A - Bn)}{M^2(B - Am)}\right|\left|\varepsilon_M\right| + \left|\frac{A - Bn}{M(B - Am)}\right|\left|\varepsilon_N\right| +$$

$$\left|\frac{AN(A - Bn)}{M(B - Am)^2}\right|\left|\varepsilon_m\right| + \left|\frac{BN}{M(B - Am)}\right|\left|\varepsilon_n\right| ;$$

Für den relativen Fehler $\delta_{T/^{14}C}$ des $T/^{14}C$-Verhältnisses gilt nach Berücksichtigung von $\varepsilon_{T/^{14}C} = \delta_{T/^{14}C} \cdot T/^{14}C$ und Gleichung [1]:

$$\left|\delta_{T/^{14}C}\right| \leqq \left|\frac{B(1 - mn)}{(B - Am)(A - Bn)}\right|\left|\varepsilon_A\right| +$$

$$\left|\frac{A(1 - mn)}{(B - Am)(A - Bn)}\right|\left|\varepsilon_B\right| + \left|\frac{1}{M}\right|\left|\varepsilon_M\right| +$$

$$\left|\frac{1}{N}\right|\left|\varepsilon_N\right| + \left|\frac{A}{B - Am}\right|\left|\varepsilon_m\right| + \left|\frac{B}{A - Bn}\right|\left|\varepsilon_n\right| \quad ; \quad [2]$$

Da der Mittelwert aller gemessenen ESKV-Werte bei 0,710 lag, wurde zunächst für diesen Wert die Abhängigkeit des relativen Fehlers $\delta_{T/^{14}C}$ von der Größe des $T/^{14}C$-Verhältnisses im Bereich von 0,07 bis 225 ermittelt. Die erhaltenen Werte ergeben die in Abb.3 dargestellte Kurve. Bei der Berechnung von $\delta_{T/^{14}C}$ für den höchsten (0,740) sowie den niedrigsten (0,680) gemessenen ESKV-Wert zeigte sich, daß die damit erhaltenen Kurven nur unwesentlich von den für ESKV = 0,710 abweichen. Damit konnten die relativen Fehler aller im Rahmen dieser Arbeit ermittelten $T/^{14}C$-Werte aus dieser Fehlerkurve (Abb.3) bestimmt werden. Bei sämtlichen Fehlerbetrachtungen wurde auf den 1σ-Vertrauensbereich bezogen.

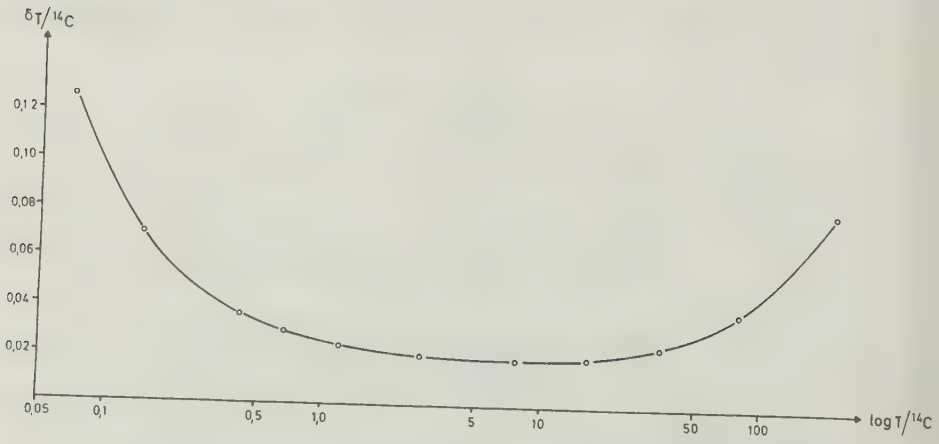


Abb. 3: Abhängigkeit des relativen Fehlers $\delta_{T/^{14}C}$ (1σ-Vertrauensbereich) von der Größe des $T/^{14}C$-Verhältnisses.

2.2. Pflanzenmaterial

Die verwendeten Versuchspflanzen von Primula clusiana Tausch wurden in der Zeit der Fruchtreife jeweils kurz vor dem Experiment aus dem Botanischen Garten München oder aus dem Alpenpflanzengarten am Schachen (Wettersteingebirge) entnommen (Tab.1) *.

2.3. Applikation der radioaktiven Substanzen

2.3.1. Tritium und ^{14}C-doppeltmarkierte Glucosen

Um die Ergebnisse der Fütterungsversuche mit den Befunden von Beck et al. (6) vergleichen zu können, wurden die radioaktiven Glucosen nach der Methode dieser Autoren appliziert. Dazu wurden jeweils zwei junge fast ganz entrollte Blättchen mit der Schnittfläche in 50 µl der Glucoselösung (vgl. Tab. 1) eingestellt.

T-positions-markierte Glucose	T/^{14}C-Wert der T-positions und ^{14}C-uniform-markierten Glucosen	Applikations-zeit (h)	Versuchs-datum	Herkunft des Pflanzen-materials (Standort)
Glucose-1-T	17,6	36	18.6.1969	I
" -2-T	16,8	24	10.5.1971	I
" -3-T	4,5	36	18.6.1969	I
" -4-T	171	24	17.6.1971	II
" -5-T	6,6	36	18.6.1969	I
" -6-T	15,4	36	18.6.1969	I

Tabelle 1. Applikation Tritium- und ^{14}C-doppeltmarkierter Glucosen an Primula clusiana

Standort I = Botanischer Garten München
" II = Alpenpflanzengarten des Botanischen Gartens München am Schachen (1866 m über NN)

Die positions-T- und uniform-^{14}C-markierten Glucosen wurden vor dem Versuch nach den Aktivitätsangaben des Herstellers in einem Radioaktivitätsverhältnis von etwa 10 : 1 gemischt.

---

* Herrn Prof. Dr. F. Schötz danke ich für die freundliche Hilfe bei der Beschaffung des Pflanzenmaterials.

Der exakte T/^{14}C-Wert der jeweiligen Glucose wurde anschließend in einem aliquoten Teil in Cocktail II bestimmt (Tab.1). Lediglich bei der Fütterung von Glucose-4-T-^{14}C (U) wurde ein wesentlich höheres T/^{14}C-Verhältnis gewählt, da in einem Vorversuch festgestellt wurde, daß in diesem Fall ein höherer T-Verlust bei der Hamamelosebiosynthese auftritt, als bei der Fütterung der übrigen positions-T-markierten Glucosen. Die Blätter wurden während der gesamten Applikationszeit (Tab.1) mit ca. 20.000 Lux belichtet. Nach Aufnahme der radioaktiven Lösung in die Blätter (ca. 2-3 Stunden) wurde bis zur Beendigung des Versuchs Wasser nachgegeben.

Die langen Fütterungszeiten von 24 bzw. 36 h waren erforderlich, da die Blätter von Primula clusiana, einer auf verhältnismäßig trockenen Standorten wachsenden Rosettenpflanze, infolge geringer Transpiration angebotene Lösungen nur sehr langsam aufnehmen. In einem Vorversuch wurde die Verteilung der Radioaktivität in einem Blatt dieser Primel 24 h nach Beginn der Fütterung einer uniform-^{14}C-markierten Glucose bestimmt. Das Ergebnis dieses Versuchs (Tab.2) zeigt, daß nach dieser Zeit noch der größte Teil

Blattabschnitte	Trockengewicht (mg)	Aktivität in Prozent der aufgenommenen Gesamtaktivität
1	2,66	0,9
2	3,81	9,5
3	4,03	27,8
4	2,66	62,0

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in einem Blatt von Primula clusiana 24 h nach Beginn der Fütterung von Glucose-^{14}C(U). 1 µCi Glucose-^{14}C(U) wurde wie unter 2.3.1 beschrieben appliziert. Nach 24 h wurde das 2 cm lange Blatt in 4 Streifen von je 5 mm Länge zerschnitten und bei 100°C getrocknet. Die Radioaktivität in den Blattstreifen wurde nach der Methode von Kalberer und Rutschmann (22) bestimmt.

der aufgenommenen Radioaktivität im unteren Teil des Blattes lokalisiert ist. Da offensichtlich noch ein großer Teil der Glucose im Leitgewebe vorhanden ist, kann während der gesamten Fütterungszeit mit einer kontinuierlichen Zufuhr von markierter Glucose an das photosynthetisierende Blattgewebe gerechnet werden.

2.3.2. $^{14}CO_2$

Für die kurzzeitigen Photosyntheseversuche mit $^{14}CO_2$ (spez. Aktivität 15 mCi/mM) wurde die von Scherpenberg et al. (23) beschriebene Apparatur verwendet, in die einzelne von der Rosette abgetrennte Blätter eingelegt wurden.

2.4. Extraktion und Fraktionierung

Die Abtötung und Extraktion der Blätter erfolgte nach der von Beck et al. (6) beschriebenen Methode. Die Radioaktivität im Äthanol-Wasser-Extrakt und im Hydrolysat wurde bei den Versuchen mit T- und ^{14}C-doppeltmarkierten Glucosen durch Messung aliquoter Teile in Cocktail II bestimmt. Bei den Photosyntheseversuchen mit $^{14}CO_2$ wurden aliquote Teile des Extrakts und des Hydrolysats in unendlich dünner Schicht mit einem fensterlosen Methandurchflußzählrohr gemessen. Die Radioaktivität des nicht hydrolysierbaren Blattrückstandes wurde nach der Methode von Kalberer und Rutschmann (22) bestimmt.

2.5. Chromatographische Auftrennung der Extrakte und Identifizierung der radioaktiven Substanzen

Alle papierchromatographischen Trennungen wurden auf Whatman-Papier Nr. 1 absteigend bei 25°C durchgeführt. Dafür wurden folgende Fließmittel verwendet:

(I) 88% (w/w) Phenol : Wasser : Eisessig : 1m Na_2EDTA = 440 : 160 : 10 : 1 (v/v)

(II) n-Butanol-Wasser (Lsg.1) : Propionsäure-Wasser (Lsg.2) = 1 : 1 (v/v)

Lsg.1: n-Butanol : Wasser = 750 : 50 (v/v)

Lsg.2: Propionsäure : Wasser = 352 : 448 (v/v)

(III)n-Butanol : Pyridin : Wasser : Eisessig = 60 : 40 : 30 : 3 (v/v)

Radioautogramme wurden auf Agfa-Gevaert - Röntgenpapier bzw. bei sehr geringen Aktivitäten auf Agfa-Gevaert-Röntgenfilm Curix RP hergestellt. Cochromatogramme mit nicht radioaktiven Vergleichssubstanzen sowie die jeweiligen Testsubstanzen wurden anschließend mit alkalischem Silbernitrat (24) angefärbt.

2.6. Isolierung von Zuckerphosphaten und -nukleotiden

Der Äthanolextrakt aus dem $^{14}CO_2$-Fixierungsversuch wurde durch zweidimensionale Papierchromatographie in Fließmittelsystem I und II aufgetrennt. Da in diesem System Zuckermonophosphate und -diphosphate sowie UDP- und ADP-Nukleotidzucker nur jeweils einen Fleck bilden, wurden die Einzelkomponenten nach Dephosphorylierung bzw. saurer Hydrolyse weiter aufgetrennt.

Die beiden Zuckerphosphatflecken wurden nach Messung der Radioaktivität auf dem Chromatographiepapier mit einem fensterlosen Methandurchflußzählrohr und Berechnung der prozentualen Aktivitätsanteile ausgeschnitten und auf dem Chromatographiepapier mit alkalischer Phosphatase * inkubiert (48h bei 30°C). Das Zuckergemisch wurde anschließend eluiert und nach Zugabe von nichtradioaktiven Testsubstanzen zweidimensional im System I und III aufgetrennt. Nach Anfertigung der Radioautogramme wurde die Radioaktivität der einzelnen Flecken bestimmt und die prozentualen Aktivitätsanteile berechnet. Die Identifizierung der einzelnen Substanzen erfolgte anschließend durch Anfärben der nichtradioaktiven Vergleichssubstanzen mit alkalischem Silbernitrat.

Die Zuckernukleotide wurden nach Messung der Radioaktivität vom Chromatogramm eluiert, 10 min mit 0,01 n HCl bei 100°C hydrolysiert und das Zuckergemisch nach Zugabe von nichtradioaktiven Testsubstanzen ebenfalls durch zweidimensionale Papierchromatographie in System I und III aufgetrennt. Die Radioaktivitätsmessung und die Identifizierung der einzelnen Substanzen auf dem Chromatogramm erfolgte wie bei der Bestimmung der Zuckerphosphatester.

---

* Fa. Boehringer Mannheim

2.7. Isolierung von radioaktiver Hamamelose, Saccharose und Glucose aus der Saccharose

Zur Gewinnung der für den Abbau verwendeten radioaktiven Hamamelose und Glucose (S) wurden die Extrakte im Fließmittel I chromatographiert und die Hamamelose bzw. Saccharosebande zur Reinigung noch zweimal in System III rechromatographiert. Zur Gewinnung der Glucose aus Saccharose wurde diese nach der Elution 6h lang bei 25°C mit Invertase inkubiert und das Hydrolysat in System III aufgetrennt.

Hamamelose wurde nur in einem Fall (Versuch mit Glucose-2-T-^{14}C (U)) noch durch Papierelektrophorese (0,05 m $Na_2B_4O_7$ × 10 H_2O; pH 9,2) (25) auf Whatman-Papier Nr. 1 bei folgenden Bedingungen gereinigt: 55 V/cm; 8°C; 90 min. Die Hamamelosebande wurde vom Pherogramm eluiert und zur Spaltung des Boratkomplexes durch eine kleine Säule mit Dowex 50Wx8 (100 - 200 mesh, H^+-Form) gegeben. Zur Entfernung der freien Borsäure als Methylester wurde mehrmals Methanol zugegeben und jeweils im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Diese zusätzliche Reinigung der Hamamelose durch Papierelektrophorese erwies sich jedoch als unnötig, da die nach dreimaliger Chromatographie noch vorhandenen radiochemischen Verunreinigungen durch Umkristallisation mit nicht radioaktiver Hamamelose (siehe Kap.2.9.) entfernt werden können.

2.8.Isolierung von kristalliner nicht radioaktiver Hamamelose

Natürlich vorkommende D-Hamamelose konnte im Gegensatz zu chemisch synthetisierter (26) bisher nicht kristallisiert werden. Durch die folgende Modifikation der Isolierungsmethode von Beck et al. (6) gelang es nun Hamamelose aus Hamamelitannin zu kristallisieren.

60 g rohes Hamamelitannin (6) wurde mit 750 ml 1n HCl 60h bei 65°C hydrolysiert, bei 50°C am Rotationsverdampfer auf die Hälfte des Volumens eingeengt, über Nacht bei 2°C aufbewahrt und die auskristallisierte Gallussäure abgenutscht. Nach Zugabe von 30 g Na_2CO_3 und Einengen auf ca. 150 ml konnte nochmals Gallussäure ausgefällt werden. Das Filtrat der zweiten Fällung wurde mit festem Na_2CO_3 neutralisiert, am Rotationsverdampfer

bis zur sirupösen Konsistenz eingeengt und nach Zugabe von ca. 100 ml Butanol zur Entfernung des restlichen Wassers bei 50°C bis zur Trockne gebracht. Zur Abtrennung des Salzes wurde der Rückstand mit Methanol kurz zum Sieden erhitzt und abgesaugt. Das Einengen des Filtrats lieferte ca. 20g zähflüssigen Sirup. Dieser wurde nach einer Vorschrift von Lemieux (27) in Portionen von je 7g auf eine Celite-Säule (6 cm Durchmesser, 75-80 cm Füllhöhe) aufgetragen; die Elution erfolgte mit wassergesättigtem n-Butanol. Aliquote Teile des Eluats wurden durch Papierchromatographie im Lösungsmittelsystem III untersucht. Die chromatographisch reine Hamamelose enthaltenden Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer bei 50°C eingeengt, und der auf diese Weise wasserfrei erhaltene Sirup in etwa 30 ml absolutem Methanol aufgenommen. Nach Entfärben der schwach gelben Lösung mit wenig Aktivkohle konnte die Hamamelose aus Methanol/Petroläther kristallisiert werden. Fp. 110°C, Lit.(26) : Fp.110 - 111°C; $[\alpha]_D^{22} = -6{,}7 \pm 0{,}5^\circ$ (W, 30 min Gleichgewichtswert), Lit. (26) $[\alpha]_D^{21} = -7{,}0^\circ$ (W, 30 min).

Der Vergleich der isolierten Hamamelose mit der von Overend und Williams (26) synthetisierten * ergab bei Papierchromatographie (Tab. 6) sowie Gaschromatographie (Tab. 7) völlige Übereinstimmung. Zum gaschromatographischen Vergleich wurden beide Zucker vor der Trimethylsililierung in Wasser equilibriert.

2.9. Bestimmung der Tritium-Einbauraten in Hamamelose, Saccharose, Glucose (S) und Fructose (S)

Die isolierte radioaktive Hamamelose wurde mit Trägersubstanz versetzt und aus Methanol/Petroläther bis zur konstanten spezifischen T- und ^{14}C-Aktivität umkristallisiert. Meist genügte ein drei- bis viermaliges Umkristallisieren mit einem Verlust von 10 - 15 % pro Kristallisation.
In einem Testversuch (Tab.3) konnte durch Umkristallisation spezifisch hoch aktiver ^{14}C-markierter Glucose mit nicht radioaktiver Hamamelose gezeigt werden, daß radiochemische Verunreinigungen der Hamamelose auf diese Weise gut entfernt werden können.

---

* Herrn Dr.N.R. Williams danke ich für eine Probe synthetischer Hamamelose.

	Prozent der eingesetzten spezifischen Radioaktivität
Nach der 1. Umkristallisation	1,72 %
Nach der 2. Umkristallisation	0,54 %

Tabelle 3: Umkristallisation nicht radioaktiver Hamamelose mit ^{14}C-markierter Glucose

1 µCi Glucose-1,6-^{14}C (spez. Akt. 2 mCi/mMol) wurde mit 75 mg kristalliner nicht radioaktiver Hamamelose versetzt und aus Methanol/Petroläther umkristallisiert.

Die isolierte radioaktive Saccharose und Glucose (S) wurde jeweils ebenso mit Trägersubstanz versetzt und aus Methanol/Petroläther bis zur konstanten spezifischen T- und ^{14}C-Aktivität kristallisiert. Dies wurde in der Regel nach ein bis zwei Umkristallisationen erreicht. Die Messung der Radioaktivität von Hamamelose, Saccharose und Glucose (S) erfolgte nach Lösen eines aliquoten Teiles mit wenig Wasser in Cocktail II.
Der $T/^{14}C$-Wert der Fructose (S) wurde nach folgender Beziehung aus den $T/^{14}C$-Werten de Saccharose und der Glucose (S) errechnet:

$$T/^{14}C_{Fruct} = 2T/^{14}C_{Sacch} - T/^{14}C_{Gluc} ;$$

Aus den $T/^{14}C$-Werten für Hamamelose ($T/^{14}C_{HA}$) und Fructose wurde das Verhältnis $T/^{14}C_{HA} : T/^{14}C_{Fruct}$ gebildet.

Für den absoluten Fehler dieses Wertes gilt:

$$\left|\varepsilon_{T/^{14}C_{HA}:T/^{14}C_{Fruct}}\right| \leqq \frac{T/^{14}C_{HA}}{T/^{14}C_{Fruct}} \cdot \left|\delta_{T/^{14}C_{HA}}\right| +$$

$$\frac{2T/^{14}C_{Sacch}}{T/^{14}C_{Fruct}} \cdot \left|\delta_{T/^{14}C_{Sacch}}\right| + \frac{T/^{14}C_{Gluc}}{T/^{14}C_{Fruct}} \cdot \left|\delta_{T/^{14}C_{Gluc}}\right| ;$$

(Die Ableitung der Gleichung wurde analog der von Gleichung [2] in 2.1.2.4.B. durchgeführt.)

2.10. Abbau der Hamamelose

Da Hamamelose und Kaliumhamamelonat kristallisiert werden konnten, war es nicht mehr notwendig, das Hamamelose-p-Nitrophenylhydrazon [6] abzubauen, wie es früher für den Abbau T-markierter Hamamelose vorgeschlagen wurde [28]. Hamamelose wurde zur Aldonsäure oxidiert, die bei Spaltung mit Perjodat Formaldehyd, Ameisensäure und Oxalsäure liefert (Abb. 4). Da bei diesem Abbau keine gefärbten Reaktionsprodukte auftreten, war es möglich sämtliche Radioaktivitätsbestimmungen durch Lösen der Substanzen im Cocktail I oder II ohne vorhergehende Verbrennung durchzuführen; damit wurden besonders für die Messung von Tritium wesentlich höhere Zählausbeuten erhalten, als dies durch Messung der Verbrennungsprodukte in einem Absorptionsgemisch möglich ist (16).

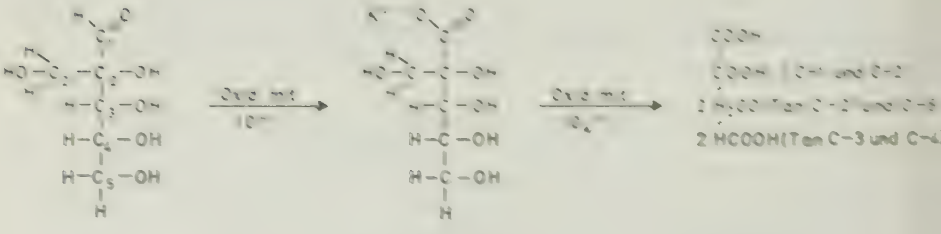


Abb. 4 Abbau von Tritium- und ^{14}C-markierter Hamamelose

2.10.1 Darstellung, Identifizierung und Charakterisierung von Kaliumhamamelonat

Die Oxidation der kristallinen Hamamelose erfolgte nach der von Moore und Link für Glucose angegebenen Methode (29):

50 mg Hamamelose und 142 mg sublimiertes Jod wurden in 2,7 ml heissem wasserfreiem Methanol gelöst. Dazu wurde bei 40°C tropfenweise unter Rühren innerhalb von 20 min 2,9 ml einer methanolischen KOH-Lösung (4 g in 100 ml) zugegeben und noch 20 min weitergerührt. Nach Aufbewahren über Nacht im Kühlschrank wurde der weisse Niederschlag abgesaugt, mit Methanol und Diäthyläther gewaschen und aus Wasser/Methanol umkristallisiert. Das Kaliumsalz der Hamamelonsäure kristallisierte in Form farbloser Nadeln.

(Ausbeute 80%, Schmp. 172-173°C); $[\alpha]_D^{22} = -8,3 \pm 0,9°$ (W)

$C_6H_{11}O_7K$ (234,3)

Ber. C 30,76 H 4,73 K 16,7*
Gef. C 31,25 H 4,88 K 16,2.

Das Ergebnis der Elementaranalyse zeigt eine gute Übereinstimmung mit den theoretischen Werten von Kaliumhamamelonat.

Die Messung der Radioaktivität von Kaliumhamamelonat erfolgte nach Lösen eines aliquoten Teiles in wenig Wasser in Cocktail II. Dabei zeigte sich, daß bereits nach einer Umkristallisation konstante T- bzw. ^{14}C-Aktivität erreicht wurde.

Zur weiteren Identifizierung wurde aus nicht radioaktivem Kaliumhamamelonat zunächst die freie Säure dargestellt, die

---

* Die gaschromatographische Bestimmung der C/H-Werte erfolgte am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München. Herrn O. Seligmann danke ich für die Erstellung der Analysen. Die flammenphotometrische Bestimmung des K-Gehaltes wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Köster, Institut für Mineralogie der TU München mit einem Zeiss-Emissions-Flammenspektrometer PMQ II bei der Wellenlänge 766,5 nm durchgeführt.

erstmals kristallisiert werden konnte. 150 mg Kaliumhamamelonat wurden mit 1 ml DOWEX 50 WX8 (100 - 200 mesh; H^+-Form) 30 min lang bei 20°C gerührt und das Filtrat bei +5°C bis zur sirupösen Konsistenz eingeengt. Beim Aufbewahren des Sirups bei -20°C bildeten sich farblose Kristallblättchen, die mit Dioxan und Äther gewaschen und anschließend bei 60°C im Vakuum getrocknet wurden. Schmp. 116 bis 118°C.

$C_6H_{12}O_7$ (196,2)

Ber. C 36,74 H 6,17,
Gef. C 37,40 H 6,25.

Die CH-Werte zeigen, daß die freie Säure und nicht ein Lacton ($C_6H_{10}O_6$ (178,2) Ber. C 40,45 H 5,66) vorliegt.

Um die synthetisierte Hamamelonsäure mit der von Freudenberg und Blümel (30) beschriebenen vergleichen zu können, wurde das Phenylhydrazid nach der Methode dieser Autoren synthetisiert. Die Tabelle 4 zeigt die Übereinstimmung der beiden Präparate.

	A	B
Schmp.	203 - 204°C	202 - 203°C
$[\alpha]_D^{22}$	+33,3 ± 3,4°(W)	+34,2 ± 3,3°(W)
Mischschmelzpunkt mit Gluconsäure-phenylhydrazid	188 - 190°C	188°C

Tabelle 4: Vergleich der Stoffwerte von synthetisiertem Hamamelossäure-phenylhydrazid (A) mit den in der Literatur (30) angegebenen Daten (B).

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Verhalten von Kaliumhamamelonat bei der Elektrophorese (Tab.5), der Papierchromatographie (Tab.6) und das ihrer Trimethylsilylderivate bei der Gaschromatographie (Tab.7) untersucht. Dabei wurde jeweils eine Aufspaltung in Anion und Lakton gefunden.

Verbindung	$R_{Pikrinsäure}$-Wert im Puffersystem	
	I	II
Hamamelonsäure	1,05	0,49
Hamamelonsäure-Lacton	0,00	0,00
Gluconsäure	1,06	0,65
Glucuronsäure	1,14	0,89

Tabelle 5: $R_{Pikrinsäure}$-Werte von Hamamelonsäure im Vergleich zu denen anderer Zuckersäuren bei Papierelektrophorese auf Whatmanpapier Nr. 1. Puffersystem und Bedingungen: I: 0,1 m Triäthylaminacetat, pH 9,7; 55 V/cm, 8°C, 60 Minuten. II: 0,2 m Ammoniumformiat, pH 3,7; 27 V/cm, 8°C, 90 Minuten.

Verbindung	$R_{Glucose}$-Wert im Fließmittelsystem		
	I	II	III
Hamamelonsäure	0,48	0,91	0,24
Hamamelonsäure-Lacton	1,45	1,89	1,83
Hamamelose	1,51	1,50	1,27
Hamamelit	1,55	1,54	1,20
Xylose	1,25	1,35	1,30
Ribose	1,56	1,67	1,50

Tabelle 6: $R_{Glucose}$-Werte von Hamamelonsäure und Hamamelonsäurelacton im Vergleich mit denen anderer Zucker bei Papierchromatographie.

Verbindung	Retentionszeiten (min)
Hamamelonsäurelacton	26,2
Hamamelonsäure	33,5
Gluconsäure-1,4-lacton	29,8
Gluconsäure	33.8
Hamamelose	27,1 ; 28,5 ; 29,5

Tabelle 7: Retentionszeiten (min) der Trimethylsilyl-Derivate von Hamamelonsäurelacton und Hamamelonsäure im Vergleich mit denen entsprechender Derivate von Gluconsäure-1.4-lacton, Gluconsäure und Hamamelose bei Gaschromatographie (Packard, Modell 7461/564) an 4% GE SE 54 auf Gaschrom Q (60-80 mesh). Bedingungen: Säulenlänge: 6ft; Temperaturprogramm: Start 120° (10 min), anschließend Temperatursteigerung von 3°C/min bis 210°C. Carriergas: N_2. Die Verbindungen wurden mit N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid gelöst und trimethylsilyliert.

2.10.2. Perjodatspaltung von Kaliumhamamelonat

Eine Lösung von 0,1 mMol Kaliumhamamelonat in 5 ml Wasser wurde mit 5 ml einer 0,2 m $NaJO_4$-Lösung versetzt und 10 min bei 25°C im Dunkeln stehen gelassen. Überschüssiges Perjodat und Jodat wurden dann nach Ansäuern mit 1 ml 5 m H_2SO_4 durch Titration mit 2 m Natriumarsenitlösung bis zum Verschwinden der Jodfärbung entfernt.

2.10.3. Isolierung von Formaldehyd

Der pH-Wert der mit Natriumarsenit titrierten Lösung wurde mit konz. NaOH auf 9 gebracht und der Formaldehyd bei 80 - 90 Torr in eine eisgekühlte Vorlage destilliert. Zur vollständigen Abtrennung des Formaldehyds wurde der Rückstand noch dreimal mit wenig Wasser versetzt und jedesmal bis zur Trockne destilliert. Dann wurde der Formaldehyd aus dem Destillat nach der Vorschrift

von Döbereiner (31) mit Dimedon ausgefällt. Dazu wurde das Destillat bei 60°C mit 8 ml 1m Natriumacetatpuffer pH 4,5 und mit 280 mg (2,0 mMol) Dimedon, das in 10 ml 50 proz. Äthanol gelöst war, versetzt und noch 20 min bei 60°C aufbewahrt. Nach dem Abkühlen wurde die Fällung über Nacht im Kühlschrank vervollständigt, das Methylenbismethon abgesaugt, aus Methanol/Wasser umkristallisiert (Ausbeute 50 - 60%), getrocknet und die Radioaktivität eines aliquoten Teils in Cocktail I gemessen.

2.10.4 Isolierung von Ameisensäure

Der bei der Formaldehyddestillation verbleibende Rückstand wurde in 20 ml Wasser aufgenommen und zur Entfernung des Jodids unter Rühren mit 20 ml Ag_2SO_4 versetzt. Nach 1 h wurde abgesaugt, das Filtrat nach Einengen auf etwa 5 ml mit 0,6 ml konz. H_3PO_4 angesäuert und die Ameisensäure bei 80 - 90 Torr in eine eisgekühlte Vorlage destilliert. Zur vollständigen Abtrennung der Ameisensäure wurde der Rückstand noch dreimal mit wenig Wasser versetzt und jedesmal bis zur Trockne destilliert. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Ameisensäure im Destillat erfolgte durch Titration mit n/10 NaOH und Messung der Radioaktivität eines aliquoten Teiles in Cocktail II. Zur Prüfung auf Aktivitätskonstanz wurde die Destillation und Messung wiederholt (Ausbeute 50 - 60 %).

2.10.5. Isolierung von Oxalsäure

Falls der Abbau auch zur Bestimmung der ^{14}C-Verteilung in der Hamamelose verwendet werden soll, kann C-1 und C-2 als Oxalsäure aus dem bei der Ameisensäuredestillation erhaltenen Rückstand mit konz. $CaCl_2$-Lösung ausgefällt werden. Der Niederschlag, der neben Calciumoxalat viel Calciumphosphat enthält, wird mit schwefelsaurer $KMnO_4$-Lösung oxidiert und das dabei entstehende CO_2 als $BaCO_3$ aufgefangen.

2.10.6. Untersuchungen zu möglichen Tritium-Isotopeneffekten bei dem Abbau von Hamamelose

2.10.6.1. Prüfung auf Isotopeneffekte bei der Umkristallisation von Hamamelose

Weygand et al. (32) beobachteten bei der Umkristallisation von D-Glucose-1-T nur nach vorheriger Behandlung mit Ammoniaklösung

einen schwachen Isotopeneffekt. Diesen konnten Isbell et al. (33) bei der Umkristallisation von D-Glucose-1-T unter normalen Bedingungen nicht nachweisen.

Zu eigenen Versuchen stand zwar keine ausschließlich 1-T-markierte Hamamelose zur Verfügung, jedoch wurde bei dem Fütterungsversuch mit Glucose-3-T-^{14}C(U) eine Hamamelose mit 67,6% der T-Aktivität an C-1 (Tab.15) erhalten. Falls ein merklicher Tritium - Isotopeneffekt vorliegt, müßte bei jeder Umkristallisation dieser Hamamelose eine gleichbleibende Abnahme des T/^{14}C-Verhältnisses beobachtet werden. Da jedoch der T/^{14}C-Wert nach 3 Umkristallisationen konstant blieb, war ein durch das Umkristallisieren bedingter sekundärer Isotopeneffekt auszuschließen.

2.10.6.2. Prüfung auf Isotopeneffekte bei der Oxidation von Hamamelose zu Hamamelonsäure

Isbell und Sniegoski (34) wiesen bei der Hypojodit-Oxidation von 1-T-markierten Aldosen einen primären Isotopeneffekt von $k_H/k_T = 7,1$ * nach. Es mußte daher geprüft werden, ob die bei der Hamameloseoxidation angewandten Reaktionsbedingungen zu einer vollständigen Oxidation führen.

Dazu wurden, da die Verhältnisse in diesem Fall auf Glucose übertragbar sind, 30 mg Glucose-1-T mit einer spezifischen Aktivität von 0,3 mCi/mMol nach der unter 2.10.1. angegebenen Vorschrift oxidiert. Da bei der Oxidation die gesamte Radioaktivität in das Reaktionswasser gelangt, sollte nach dessen restloser Entfernung im Rückstand keine Aktivität mehr gefunden werden. Das T-haltige Reaktionswasser wurde nach Abtrennen des ausgefallenen Kaliumgluconats durch mehrmaliges Abdestillieren bei 12 Torr aus der Mutterlauge entfernt. In dem Rückstand, der neben wenig Kaliumgluconat nicht oxidierte Glucose-1-T enthalten konnte, wurde nur mehr 0,96 % der eingesetzten Aktivität gefunden. In dem umkristallisierten Kaliumgluconat fanden sich noch 0,44 % der Ausgangsaktivität, wobei dieser Wert geringfügige T-Nebenaktivitäten an den Positionen C-2 bis

---

* k_H = Reaktionsgeschwindigkeit der nicht markierten Substanz
k_T = Reaktionsgeschwindigkeit der T-markierten Substanz
(In der Literatur (34) ist der reziproke Wert k_T/k_H angegeben)

C-6 anzeigt.

Es kann also, da bei den gewählten Reaktonsbedingungen eine mehr als 99proz. Oxidation der 1-T-markierten Aldose erfolgt, eine Verfälschung der Abbauergebnisse durch den oben erwähnten primären Isotopeneffekt ausgeschlossen werden.

2.10.6.3. Prüfung auf Isotopeneffekte bei der Perjodatspaltung und der Isolierung von Formaldehyd

Simon und Heubach (35) zeigten, daß bei der Perjodatspaltung von Glucose-6-T bei 60°C und ph 5,4 kein sekundärer Isotopeneffekt auftritt. Jedoch wird bei Anwendung eines Perjodatüberschusses unter diesen Bedingungen der Formaldehyd relativ rasch weiter oxidiert, wobei der markierte Formaldehyd durch einen intramolekularen Isotopeneffekt angereichert wird.

Dieselben Autoren berichten (35,36), daß bei der Destillation wässeriger Formaldehydlösungen ein überraschend großer Isotopeneffekt auftritt. Er wird als Gleichgewichtsisotopeneffekt angesehen, der durch eine unterschiedliche Hydratisierung des markierten und nicht markierten Formaldehyds bedingt ist. Bei unvollständiger Destillation führt er zu einer zu niedrigen spezifischen T-Aktivität im Destillat. Außerdem tritt bei nur partieller Fällung von Formaldehyd-T mit Dimedon oder 2,4-Dinitrophenylhydrazin ein sekundärer Isotopeneffekt (k_H/k_T=1,16) auf (35).

In den folgenden Versuchen wurde geprüft, ob diese Isotopeneffekte bei dem verwendeten Hamameloseabbau eine Verfälschung der Abbauergebnisse verursachen können.

a. Prüfung auf eine mögliche Perjodat - Überoxidation

Nicht radioaktives Kaliumhamamelonat wurde wie unter 2.10.2. beschrieben bei 25°C im Dunkeln gespalten. Aus dem Reaktionsgemisch wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und der Perjodatverbrauch nach Avigad (37) sowie der gebildete Formaldehyd nach Belcher et al. (38) gemessen. Bei dem Ergebnis (Tab.8) zeigt die gleichbleibende Perjodat- und Formaldehydkonzentration, daß nach der Spaltung, die unter den gewählten

Bedingungen in weniger als 30 sec. abläuft, keine weitere Oxidation mehr auftritt.

Spaltungsdauer (min)	µMol Formaldehyd / µMol K-Hamamelonat	µMol JO_4^- (verbraucht) / µMol K-Hamamelonat
0,5	2,05	-
2,0	1,98	-
5,0	1,91	3,90
15	1,98	-
30	2,01	3,95
60	1,69	-
75	-	3,85

Tabelle 8: Kinetik der Perjodatspaltung von Kalium-Hamamelonat.
- = nicht gemessen

b. Prüfung auf einen Isotopeneffekt bei der Isolierung von Formaldehyd-T-^{14}C aus einem simulierten Spaltansatz von Kaliumhamamelonat

Zur Gewinnung von T-markiertem Formaldehyd wurde Glucose-6-T mit $NaBH_4$ reduziert, der gebildete Sorbit mit Trägersubstanz versetzt und wie unter 2.10.2. beschrieben mit Perjodat gespalten. Der T-markierte Formaldehyd wurde durch Destillation wie unter 2.10.3. beschrieben isoliert. Dazu wurde frisch destillierter Formaldehyd-^{14}C gegeben und folgender simulierter Hamamelonat-Spaltansatz zusammengestellt:

0,26 mMol Formaldehyd-T-^{14}C
spez. T-Aktivität: 4,96 10^6 dpm/mMol, T/^{14}C = 3,67
0,13 mMol $K_2C_2O_4$
0,26 mMol HCOONa
in 6 ml Wasser
6 ml 0,2 m $NaJO_4$

Nach 10 min Stehen im Dunkeln wurde wie unter 2.10.2. und 2.10.3. beschrieben aufgearbeitet. Das T/^{14}C-Verhältnis des Formaldehyds

wurde vor der Perjodatzugabe, im Destillat und nach der Fällung als Methylenbismethon bestimmt.

Die Meßwerte in Tabelle 9 zeigen, daß unter diesen Versuchsbedingungen bei keinem der geprüften Arbeitsgänge das $T/^{14}C$-Verhältnis des Formaldehyds durch einen Isotopeneffekt verändert wird.

Zeitpunkt der Radioaktivitätsbestimmung	$T/^{14}C$
Vor der Perjodatzugabe	3,67 ± 0,08
Nach der Destillation des Formaldehyds	3,70 ± 0,08
Nach der Fällung als Methylenbismethon	3,69 ± 0,08

Tabelle 9: $T/^{14}C$-Werte von Formaldehyd-T-^{14}C bei der Isolierung aus einem simulierten Kalium-Hamamelonat-Spaltansatz

2.10.6.4. Prüfung auf Isotopeneffekte bei der Isolierung von Ameisensäure

Simon et al. (39) haben gezeigt, daß bei der Destillation von T- und ^{14}C-markierter Ameisensäure weder ein T-Austausch noch ein nennenswerter Isotopeneffekt auftritt. In dem folgenden Versuch wurde überprüft, ob dies auch für die in diesem Abbau gewählten Aufarbeitungsbedingungen zutrifft. Dazu wurde folgender simulierter Perjodat-Spaltansatz zusammengestellt:

0,1 mMol $K_2C_2O_4$

0,2 mMol Natriumformiat-$T/^{14}C$
spez. T-Aktivität: $33,7 \cdot 10^6$ dpm/mMol, $T/^{14}C = 4,58$
in 5 ml Wasser

5 ml 0,2 m $NaJO_4$

Dieser Ansatz wurde wie unter 2.10.2. bis 2.10.4. beschrieben aufgearbeitet und das $T/^{14}C$-Verhältnis der Ameisensäure nach der Ag_2SO_4-Fällung sowie nach der ersten und zweiten Destillation bestimmt. Die Meßwerte in Tabelle 10 zeigen, daß keine Änderung des $T/^{14}C$-Wertes feststellbar ist und somit ein Isotopeneffekt bei der Isolierung der Ameisensäure ausgeschlossen werden kann.

Zeitpunkt der Radioaktivitätsbestimmung	$T/^{14}C$
Im Ansatz	4,58 ± 0,10
Nach der Ag_2SO_4-Fällung	4,52 ± 0,09
Nach der 1. Destillation	4,53 ± 0,09
Nach der 2. Destillation	4,54 ± 0,09

Tabelle 10: $T/^{14}C$-Werte von Ameisensäure-T-^{14}C bei der Isolierung aus einem simulierten Kalium-Hamamelonat-Spaltsatz.

2.10.7. Auswertung der Abbauergebnisse

Ergebnis des Hamameloseabbaus sind die $T/^{14}C$-Werte der Hamamelose ($T/^{14}C_{HA}$), der Hamamelonsäure ($T/^{14}C_{HS}$), des Formaldehyds ($T/^{14}C_{FA}$) und der Ameisensäure ($T/^{14}C_{AS}$).

Die Teilaktivitäten von Tritium in Prozent der T-Aktivität der Hamamelose an den einzelnen C-Positionen lassen sich folgendermaßen errechnen:

$$T_{an\ C\text{-}1} = 100 \cdot \left[1 - \frac{T/^{14}C_{HS}}{T/^{14}C_{HA}} \right] ;$$

$$T_{an\ C\text{-}2^1 + C\text{-}5(C\text{-}3 + C\text{-}4)} = \frac{100\ T/^{14}C_{FA(AS)}}{3\ T/^{14}C_{HA}} ;$$

Bei diesen Gleichungen ist zu berücksichtigen, daß der $T/^{14}C$-Wert der Hamamelose im Nenner mit dem Faktor 6 mutipliziert werden muß.

Für den absoluten Fehler der Teilaktivitäten, der aus den bekannten Fehlern der $T/^{14}C$-Werte errechnet wird, gilt:

$$\left|\varepsilon_{T_{an\ C-1}}\right| \leq \frac{100\ T/^{14}C_{HS}}{T/^{14}C_{HA}} \left[\left|\delta_{T/^{14}C_{HS}}\right| + \left|\delta_{T/^{14}C_{HA}}\right|\right] ;$$

$$\left|\varepsilon_{T_{an\ C-2^1+C-5(C-3+C-4)}}\right| \leq T_{an\ C-2^1+C-5(C-3+C-4)} \cdot \left[\left|\delta_{T/^{14}C_{FA(AS)}}\right| + \left|\delta_{T/^{14}C_{HA}}\right|\right] ;$$

(Die Ableitungen dieser Gleichungen wurden analog der von Gleichung [2] in 2.1.2.4.B. durchgeführt.)

2.11. Abbau der Glucose

Tritium- und ^{14}C-doppeltmarkierte Glucose wurde nach der Methode von Simon et al.(39-41) über das Glucose-phenylosotriazol (GPOT) abgebaut. bei diesem Abbau wird T an C-2 aus der Differenz der $T/^{14}C$-Werte von Glucose und Glucose-phenylosazon bzw. GPOT berechnet. Die Perjodatspaltung des GPOT liefert Formaldehyd (T an C-6), Ameisensäure (T an C-4 + C-5) und N-Phenyl-triazolaldehyd (T an C-1 + C-3), der zu N-Phenyl-triazolcarbonsäure (T an C-1) oxidiert wird. T an C-3 läßt sich dann aus der Differenz der $T/^{14}C$-Werte von Aldehyd und Carbonsäure berechnen. T an C-4 wird durch Perjodatspaltung des 6-Benzoyl-GPOT bestimmt, wobei nach Simon et al.(41) aber 4 - 5 % der Ameisensäure aus C-5 stammen. Daher wurde mit einer Ausnahme (vgl. Tab.16) auf die getrennte Bestimmung von T an C-4 verzichtet.

2.11.1. Eigene Modifikationen des Abbaus nach Simon et al.(39-41)

Aus der bis zum konstannten $T/^{14}C$-Verhältnis umkristallisierten Glucose(S) wurde das Osazon und das GPOT nach Vorschrift darge-

stellt (41). Bei der Perjodatspaltung des GPOT und der Aufarbeitung des Spaltgemisches wurde die Vorschrift (39-41) in folgender Weise modifiziert. Um eine eventuelle Überoxidation des Formaldehyds bei der Perjodatspaltung zu vermeiden (siehe 2.10.6.3.) wurde nicht bei 100°C sondern bei Zimmertemperatur gespalten, wozu das in Wasser schwer lösliche GPOT in 40 proz. Äthanol gelöst werden mußte.

Es wurden 0,4 mMol GPOT in 40 ml 40proz. Äthanol gelöst und mit 12 ml 0,2 m $NaJO_4$ versetzt. Nach 30 min Stehen im Dunkeln bei 25°C wurde das überschüssige Perjodat und Jodat wie unter 2.10.2. beschrieben mit Natriumarsenit entfernt, und anschließend mit konz. NaOH pH 9 eingestellt. Zur Abtrennung des gelösten N-Phenyl-triazolaldehyds wurde dreimal mit Äther extrahiert. Der Extrakt wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde ein Teil des Aldehyds aus Wasser umkristallisiert. Die Oxidation zur Carbonsäure erfolgte nach Vorschrift (40,41). Die Isolierung von Formaldehyd und Ameisensäure wurde wie unter 2.10.3. und 2.10.4. beschrieben durchgeführt.

Die Kinetik des Perjodatsverbrauchs bei der Spaltung des GPOT und des dabei gebildeten Formaldehyds wurde wie unter 2.10.6.3.a beschrieben , untersucht. Dabei zeigte sich, daß ein Verbrauch von 3,0 mMol JO_4^-/mMol GPOT und der Formaldehydgehalt von 1,0 mMol/mMol GPOT innerhalb der gemessenen Zeitspanne zwischen 0,8 min und 3 h konstant war.

Außerdem wurde die Bestimmung des Tritiumgehalts an C-6 in einem Probeabbau mit Glucose-6-T-^{14}C(U) überprüft. Das Ergebnis dieses Kontrollversuchs zeigt Tabellle 11.

T - Teilaktivität in Prozent an den Positionen					Aktivitäts-bilanz
C-1	C-2	C-3	C-4+C-5	C-6	
0,0	1,5	0,0	1,8	96,7	98,5 %

Tabelle 11: Verteilung von Tritium in Glucose-6-T-^{14}C(U) (Probeabbau)

Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden Glucose und Natriumformiat nach Lösen mit wenig Wasser in Cocktail II gemessen. N-Phenyl-triazolaldehyd und Methylenbismethon wurden direkt in Cocktail I gelöst. GPOT und N-Phenyl-triazolcarbonsäure konnten nach Lösen in wenig Methanol ebenfalls in Cocktail I gemessen werden. Um die Vorteile der direkten Messung auszunützen wurde die T/^{14}C-Bestimmung an dem farblosen GPOT und nicht an dem gelb gefärbten Glucose-phenylosazon vorgenommen.

2.11.2. Auswertung der Abbauergebnisse

Die Teilaktivitäten von Tritium in Prozent der T-Aktivität der Glucose an den einzelnen C-Positionen lassen sich folgendermaßen errechnen:

$$T_{an\ C\text{-}1} = \frac{100\ T/^{14}C_{PTS}}{2\ T/^{14}C_{Gluc}} \quad ;$$

$$T_{an\ C\text{-}2} = 100 \left[1 - \frac{T/^{14}C_{GPOT}}{T/^{14}C_{Gluc}} \right] \quad ;$$

$$T_{an\ C\text{-}3} = \frac{100}{2\ T/^{14}C_{Gluc}} \left[T/^{14}C_{PTA} - T/^{14}C_{PTS} \right] \quad ;$$

$$T_{an\ C-4+C-5} = \frac{100\ T/^{14}C_{AS}}{3\ T/^{14}C_{Gluc}} \quad ;$$

$$T_{an\ C-6} = \frac{100\ T/^{14}C_{FA}}{6\ T/^{14}C_{Gluc}} \quad ;$$

GPOT = Glucose-phenylosotriazol
PTA = N-Phenyl-triazolaldehyd
PTS = N-Phenyl-triazolcarbonsäure
AS = Ameisensäure
FA = Formaldehyd

Für die absoluten Fehler der Teilaktivitäten, die aus den bekannten Fehlern der $T/^{14}C$-Werte errechnet werden, gilt:

$$\left|\varepsilon_{T_{an\ C-1}}\right| \leq T_{an\ C-1} \cdot \left[\left|\delta_{T/^{14}C_{PTS}}\right| + \left|\delta_{T/^{14}C_{Gluc}}\right|\right] \quad ;$$

$$\left|\varepsilon_{T_{an\ C-2}}\right| \leq \frac{100\ T/^{14}C_{GPOT}}{T/^{14}C_{Gluc}} \cdot \left[\left|\delta_{T/^{14}C_{GPOT}}\right| + \left|\delta_{T/^{14}C_{Gluc}}\right|\right] \quad ;$$

$$\left|\varepsilon_{T_{an\ C-3}}\right| \leq \frac{50}{T/^{14}C_{Gluc}} \cdot \left[\left|T/^{14}C_{PTA} \cdot \delta_{T/^{14}C_{PTA}}\right| + \left|T/^{14}C_{PTS} \cdot \delta_{T/^{14}C_{PTS}}\right| + (T/^{14}C_{PTA} - T/^{14}C_{PTS}) \cdot \left|\delta_{T/^{14}C_{Gluc}}\right|\right] \quad ;$$

$$\left|\varepsilon_{T_{an\ C-4+C-5}}\right| \leq T_{an\ C-4+C-5} \cdot \left[\left|\delta_{T/^{14}C_{AS}}\right| + \left|\delta_{T/^{14}C_{Gluc}}\right|\right] \quad ;$$

$$\left|\varepsilon_{T_{an\ C-6}}\right| \leq T_{an\ C-6} \cdot \left[\left|\delta_{T/^{14}C_{FA}}\right| + \left|\delta_{T/^{14}C_{Gluc}}\right|\right] \quad ;$$

(Die Ableitungen dieser Gleichungen wurden analog der von Gleichung [2] in 2.1.2.4.B. durchgeführt.)

3. Versuchsergebnisse

3.1 Untersuchungen über das Auftreten von Zwischenprodukten der Hamamelosesynthese in Primula clusiana

3.1.1. Nachweis von Hamamelosediphosphat und -monophosphat

Beck et al. (6) wiesen HMP neben Hamamelose zunächst in Primel- (Primula clusiana) später auch in Spinatblättern nach. Dagegen wurde HDP nur in isolierten Spinatchloroplasten gefunden(10). Da Hamamelose nach Eickenbusch et al. (5) wahrscheinlich in den Chloroplasten gebildet wird, liegt die Vermutung nahe, daß HDP im Chloroplasten entsteht und dann schrittweise zu HMP und freier Hamamelose dephosphoryliert wird.

Diese Vorstellung könnte durch den Nachweis von Hamamelose (zusammen mit Hamamelit*), HMP und HDP nebeneinander in ganzen Blättern unterstützt werden. Da Phosphatester in Blättern nur in sehr kleinen Konzentrationen auftreten, wurde versucht sie durch ^{14}C-Markierung bei Photosynthese in $^{14}CO_2$-haltiger Luft nachzuweisen.

Dazu wurde ein voll entwickeltes Blatt von Primula clusiana wie im Abschnitt 2.3.2. beschrieben in $^{14}CO_2$-haltiger Luft belichtet, mit wässrigem Äthanol ausgekocht und der Extrakt papierchromatographisch aufgetrennt. Nach Dephosphorylierung der Zuckermonophosphate und -diphosphate bzw. Hydrolyse der Nukleotid-Zucker konnten die einzelnen Monosaccharidkomponenten chromatographisch identifiziert werden. Dabei zeigte sich, daß sowohl aus den Monophosphat- wie auch aus den Diphosphatestern ^{14}C-Hamamelose freigesetzt wurde, nicht aber aus den Nukleotid-Zuckern. Wie auch in den Versuchen von Beck et al. (6) enthielt der Extrakt der Primelblätter bereits nach kurzzeitiger Photosynthese in $^{14}CO_2$-haltiger Luft relativ viel freie ^{14}C-markierte

---

* In den verwendeten Fließmitteln können Hamamelose und Hamamelit papierchromatographisch nicht ausreichen getrennt werden. Jedoch zeigten Sellmair und Kandler (9), daß nach 30 min Fixierungsdauer erst 5,5% der gebildeten Hamamelose zu Hamamelit reduziert worden sind. Somit liegt nach kurzen Fixierungszeiten nahezu ausschließlich Hamamelose vor.

Hamamelose. Damit sind HDP, HMP und Hamamelose (zusammen mit Hamamelit) erstmals nebeneinander in einem Blattextrakt nachgewiesen worden.

Die Suche nach einem weiteren bereits von Beck et al. (6) postulierten Zwischenprodukt der Hamamelosebiosynthese, nämlich 5-Keto-D-Fructosemonophosphat oder -diphosphat * verlief bisher erfolglos.

3.1.2. Kinetik der Markierung von HDP, HMP und freier Hamamelose (mit Hamamelit) bei Photosynthese in $^{14}CO_2$-haltiger Luft

Der Verlauf der Biosynthese in Hamamelose über ihren Diphosphat- und Monophosphatester sollte in einer entsprechenden Kinetik der ^{14}C-Markierungen von HDP, HMP und freier Hamamelose bei Photoassimilation von $^{14}CO_2$ zum Ausdruck kommen.

Um dies zu prüfen wurde ein voll entwickeltes Blatt von Primula clusiana in der Apparatur nach van Scherpenberg et al. (23) 10 min in Luft und 1% $^{12}CO_2$ vorbelichtet, um einen gewissen "Steady-State" der Photosynthese zu erreichen. Nach Umschalten auf Luft und 1% $^{14}CO_2$ wurden nach 1, $2\frac{1}{2}$, und 10 Min jeweils möglichst gleichgroße Stücke von dem Blättchen abgeschnitten und in der beschriebenen Weise (siehe Abschnitt 2.4. - 2.6.) aufgearbeitet. Eine weitere Ausdehnung des Experiments auf längere Versuchszeiten erwies sich als ungünstig, da seinerseits bei Entnahme von mehr als drei Proben die einzelnen Blattstückchen zu klein werden und damit für die umfangreiche Aufarbeitung zu wenig Radioaktivität enthalten und andererseits der relative Anteil der Zuckerdiphosphate am assimilierten ^{14}C so klein wird, daß seine Bestimmung mit einem sehr großen Fehler behaftet ist.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tab. 12 und Abb. 5 zusammengestellt. Tab. 12 zeigt, daß die Fixierungsrate während der ersten 10 min einigermaßen konstant bleibt, wobei kleinere Abweichungen auf die größenmäßig nicht genau gleichen Blattstückchen zurückgeführt werden können. Ribulose-Mono- und

---

* Ich danke Prof. Sasha Englard, A. Einstein College of Medicine, Yeshiva University, New York, für die Überlassung einer Probe von authentischer 5-Keto-D-Fructose.

-Diphosphat wurde nicht aufgeführt, da diese Verbindungen bei der alkalischen Dephosphorylierung im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Zuckerphosphaten teilweise zugrunde gehen.

Photosynthesedauer		1 min	2,5 min	10 min
^{14}C - Fixierung (μCi)		1,21	3,44	19,20
Prozent der Gesamtassimilation	Glucose- Diphosphat	0,32	0,34	0,17
	Fructose- " "	0,75	0,41	0,25
	Sedoheptulose- " "	0,13	0,24	0,06
	Hamamelose- " "	0,17	0,14	0,03
	Glucose- Monophosphat	8,20	11,3	5,9
	Fructose- " "	2,51	2,8	1,5
	Sedoheptulose- " "	6,20	8,0	2,6
	Hamamelose- " "	0,40	0,23	0,19
	Hamamelose (+Hamamelit)	0,56	0,67	2,05

Tabelle 12: Verteilung der Radioaktivität in den Zuckerphosphaten aus Blättern von Primula clusiana nach verschiedenen Photosynthesezeiten in $^{14}CO_2$-haltiger Luft.

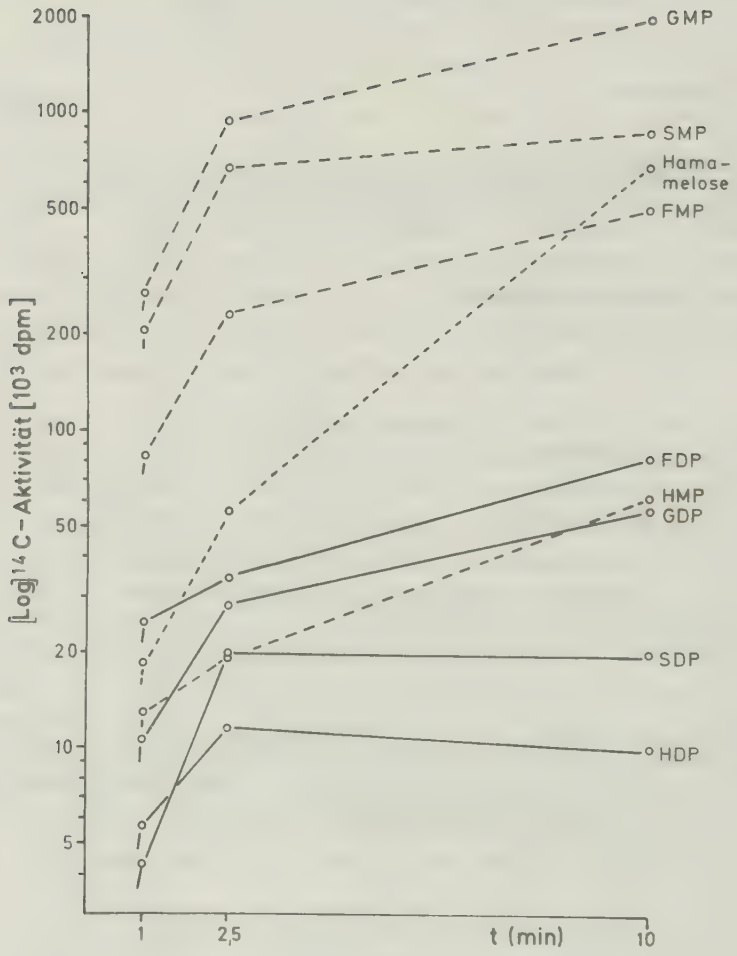


Abb. 5 : Kinetik der ^{14}C-Markierung in den Zuckerphosphaten aus Blättern von Primula clusiana nach verschiedenen Photosynthesezeiten in $^{14}CO_2$.

Trägt man nach Bestimmung der mittleren Fixierungsrate (pro Blattstück) und Berechnung der Absolutwerte des ^{14}C-Einbaus in die Zuckerphosphate diese Werte gegen die Zeit auf (Abb. 5), so sieht man, daß die Pools von HDP und SDP, deren Umfang offensichtlich in der gleichen Größenordnung liegt, bereits nach etwa 2,5 Min den maximalen ^{14}C-Gehalt haben, während die von GDP und FDP auch nach 10 Min. noch keine Sättigung mit Radiokohlenstoff erkennen lassen. Da die letzteren offensichtlich wesentlich größer sind als die ersteren, benötigen sie bei gleich schnellem Umsatz eine längere Zeit zur vollständigen Markierung mit ^{14}C. Aus der schnellen Sättigung des allerdings relativ kleinen HDP-Pools mit ^{14}C darf man auf einen raschen "Turnover" von HDP schließen. Dieser könnte zumindest zum Teil auf die Reaktionen der HDP-Synthese und HDP-Dephosphorylierung zurückzuführen sein. Ein nicht durch Dephosphorylierung bedingter Umsatz von HDP ist jedoch nach den Untersuchungen von Beck (42) ebenfalls anzunehmen.

Verglichen mit HDP zeigt die Kinetik der ^{14}C-Markierung von HMP während der ersten 10 min ein grundsätzlich anderes Verhalten. Während die Pools von GMP, FMP und besonders SMP nach dieser Zeit eine Tendenz zur Sättigung mit ^{14}C erkennen lassen, reichert der HMP-Pool in dieser Zeit etwa linear weiter Radiokohlenstoff an, obwohl er kleiner als die der genannten übrigen Monophosphatester sein dürfte. HMP wird also im Vergleich zu den übrigen Zuckermonophosphaten langsamer umgesetzt.

Freie Hamamelose (mit Hamamelit) zeigt die Markierungskinetik eines Stoffwechselendprodukts, d.h. die Radioaktivität dieser Verbindung nimmt laufend zu. Im Gegensatz zu der während der ersten 10 min etwa konstanten Rate des ^{14}C-Einbaus in HMP wächst die Rate der ^{14}C-Hamamelosesynthese während dieses Zeitraums laufend an.

Unter der wohl zu vertretenden Voraussetzung, daß die Hamameloseproduktion in den einzelnen verwendeten Blattstücken in gleichem relativen Umfang abläuft, muß man demnach annehmen, daß die Hamamelosesynthese trotz "Steady-State"-Außenbedingungen ihren

"Steady-State" in dem untersuchten Zeitraum noch nicht erreicht hatte.

Die ^{14}C-Markierungskinetik von Hamamelosephosphaten und freier Hamamelose im Photosyntheseexperiment zeigt also deutlich, daß die biogenetische Reihenfolge dieser Verbindungen HDP ⟶ HMP ⟶ freie Hamamelose sein muß. Im umgekehrten Fall, wenn - in Analogie z.B. zur Glycolyse - HDP über HMP aus freier Hamamelose entstünde, dürfte der Pool von HDP die Sättigung mit ^{14}C nicht zu einem Zeitpunkt erreichen, zu dem die Syntheserate der freien ^{14}C-Hamamelose noch ansteigt.

Legt man nun die gefundene Biosynthesequenz zugrunde, so lassen sich die ^{14}C-Markierungskinetiken zwanglos mit einer Steigerung der HMPase-Aktivität innerhalb des untersuchten Zeitraums erklären, wobei der Umsatz auch auf die Dephosphorylierungsreaktion von HDP und HMP beschränkt bleiben könnte. Das Resultat einer solchen Aktivierung wäre ein verhältnismäßig langes Anwachsen des HMP-Pools bei gleichzeitiger Steigerung der Syntheserate von freier Hamamelose (und freiem Hamamelit). Eine Aktivierung von Phosphatasen z.B. durch Licht ist bereits wiederholt gezeigt worden (43).

3.2. Einbau von Tritium in Hamamelose aus positionsmarkierter Glucose

Beck et al. (6) zeigten, daß Hamamelose in Blättern von Primula clusiana aus exogener Glucose gebildet wird. Durch Applikation positions- ^{14}C-markierter Glucosen klärten sie die biogenetischen Beziehungen zwischen den einzelnen Kohlenstoffatomen der Glucose und der Hamamelose auf und postulierten auf Grund ihrer Ergebnisse, daß Hamamelose durch eine intramolekulare Umlagerung aus einer unverzweigtkettigen Hexose entsteht.

Durch Bestimmung des spezifischen T-Einbaus aus den einzelnen Positionen der Glucose in die entsprechenden der Hamamelose wurde nun in dieser Arbeit versucht, weitere Hinweise intramolekulare Umlagerung bei der Hamamelose-Biosynthese zu erbringen, wie auch Aufschlüsse über den Mechanismus dieser Umlagerung zu erhalten.

Wie in Abschnitt 1. erwähnt, kann der spezifische T-Einbau beim Arbeiten mit ganzen Blättern, die in ihrem physiologischen Verhalten auf keinen Fall völlig gleich sind, nur durch den jeweiligen Bezug der T-Aktivität auf eine gleichzeitig applizierte und bestimmte ^{14}C-Aktivität gemessen werden. Deshalb wurde immer ein Gemisch aus T-positions- und ^{14}C-uniformmarkierter Glucose gefütter. Je zwei junge Primel-Blättchen wurden wie in den Abschnitten 2.3.1. und 2.4. beschrieben 24 bzw. 36 h in die radioaktive Glucoselösung eingestellt und anschließend mit wässrigem Äthanol ausgekocht. Zur Bestimmung des Gesamteinbaus von T und ^{14}C wurde weiterhin die Radioaktivität der mit Säure hydrolysierbaren Fraktion (vorwiegend Stärke) sowie des unlöslichen Rückstandes gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 zusammengestellt.

Der unterschiedliche Einbau von Tritium und Radiokohlenstoff bei den einzelnen Fütterungsexperimenten in diese drei Fraktionen zeigt, daß erhebliche Unterschiede im physiologischen Zustand der einzelnen Blätter vorliegen. Immerhin sind d e Werte, die bei den Versuchen mit Glucose-1-T-$^{14}C(U)$, -3-T-$^{14}C(U)$, -5-T-$^{14}C(U)$ und -6-T-$^{14}C(U)$ erhalten wurden, untereinander relativ gut vergleichbar; bei der 2 Jahre später vorgenommeen Applikation von Glucose-2-T-$^{14}C(U)$ und -4-T-$^{14}C(U)$ wurden zwar wieder untereinander ähnliche, aber von denen der übrigen Fütterungsversuche recht verschiedene T- und ^{14}C-Verteilungen über die drei Fraktionen erhalten, die nicht nur auf die kürzere Applikationszeit (24 statt 36 h) zurückgeführt werden können.

Aus den Äthanol-Wasser-Extrakten wurden dann wie in Abschnitt 2.9 beschrieben die radioaktiv markierten Hamamelosen isoliert und die T/^{14}C-Einbauraten bestimmt. Um Aussagen über spezifische T-Verluste bei der Hamamelose-Biosynthese machen zu können, sollten die T/^{14}C-Einbauraten der Hamamelose mit denen eines Metaboliten verglichen werden, der der Ausgangssubstanz für die Umlagerung aller Voraussicht nach biogenetisch nahe steht.

Da Hamamelose nach Beck et al. (6) wahrscheinlich aus einem Fructosephosphat im Chloroplasten gebildet wird, liegt es nahe,

Markierte Positionen der appl. Glucosen		Äthanol-Wasser-Extrakt	Hydrolysat	Unlöslicher Rückstand
1-T-^{14}C(U)	^{14}C (10^6dpm)	28,45	7,42	2,85
	T/^{14}C	6,72	5,05	5,16
2-T-^{14}C(U)	^{14}C (10^6dpm)	18,05	11,00	7,18
	T/^{14}C	6,26	8,21	4,58
3-T-^{14}C(U)	^{14}C (10^6dpm)	6,23	1,36	0,56
	T/^{14}C	2,43	0,85	1,14
4-T-^{14}C(U)	^{14}C (10^6dpm)	6,01	5,60	3,09
	T/^{14}C	60,60	57,80	44,30
5-T-^{14}C(U)	^{14}C (10^6dpm)	27,26	2,79	1,31
	T/^{14}C	3,71	1,22	',63
6-T-^{14}C(U)	^{14}C (10^6dpm)	33,44	3,41	1,42
	T/^{14}C	9,04	3,19	5,23

Tabelle 13 : Verteilung der Radioaktivität in Blättern von Primula clusiana nach Fütterung von positions-T- und uniform-^{14}C- markierten Glucosen im Licht.

FMP oder FDP als Bezugssubstanz zu wählen. Jedoch war der Aktivitätsanteil, der nach 24 bzw. 36-stündiger Applikationszeit von radioaktiver Glucose in den Zuckerphosphaten gefunden wurde, so klein, daß die Radioaktivitätsmessungen mit einem viel zu hohen Fehler belastet werden. Daher mußte eine andere Fructose-haltige Verbindung verwendet werden, die ausreichend radioaktiv markiert ist und über ein Fructosephosphat gebildet wird. Dafür bot sich besonders die Saccharose an, nachdem Beck et al.(6) zeigten, daß in Blättern von Primula clusiana bei Applikation von Glucose-^{14}C im Licht (30 h) ein großer Teil der Aktivität (11 - 29% der Gesamtassimilation) in die Saccharose eingebaut wird. Außerdem wiesen Bird et al.(44) sowie Delmer und Albersheim (45) nach, daß die Saccharosesynthese im Chloroplasten abläuft, und Eickenbusch et al.(5) zeigten, daß Hamamelose- und Saccharose-Biosynthese in Primula clusiana eng mit dem photosynthetischen Kohlenhydratzyklus korreliert sind. Der Vergleich der T/^{14}C-Einbauraten der Hamamelose mit denen der Fructose(S) sollte also spezifische T-Verluste bei der Biosynthese der Hamamelose zeigen.

Die T/^{14}C-Einbauraten in die Saccharose, die Fructose(S) und die Glucose(S) wurden nach Isolierung der Saccharose aus dem Äthanol-Wasser-Extrakt wie in Abschnitt 2.9. beschrieben, bestimmt und mit den Einbauraten der Hamamelose in Tabelle 14 zusammengestellt.

Die T/^{14}C-Werte von Glucose(S) und Fructose(S) können innerhalb der Fehlergrenzen jeweils als annähernd gleich betrachtet werden. Eine Ausnahme bildet erwartungsgemäß nur der Versuch mit Glucose-2-T-^{14}C(U), bei dem das T/^{14}C-Verhältnis der Glucose(S) mehr als doppelt so hoch ist, wie das der Fructose(S). Dieser Unterschied ist auf den großen Isotopeneffekt und die nicht vollständige Intramolekularität des Wasserstoffübergangs bei der Glucose-Phosphat-Isomerasereaktion zurückzuführen. Galdeano und Simon (46) bestimmten für den Wasserstoffübergang bei der Reaktion G-6-P $\longrightarrow$ F-6-P mit GPI aus Hefe (Muskel) einen Isotopeneffekt von 5,8 (4,4) und eine Intramolekularität von 68% (80%). Fedke (47) fand bei GPI aus Spinatblättern eine Intramolekularität von ca. 70%.

Markierte Positionen der appl. Glucosen	Appl. Glucose ($T/^{14}C$)	Saccharose ($T/^{14}C$)	Glucose(S) ($T/^{14}C$)	Fructose(S) ($T/^{14}C$)	Hamamelose ($T/^{14}C$)	Hamamelose / Fructose(S) ($T/^{14}C$:$T/^{14}C$)
1-T-^{14}C(U)	17,6 ± 0,4	7,19 ± 0,14	7,19 ± 0,14	7,19 ± 0,28	3,76 ± 0,07	0,52 ± 0,04
2-T-^{14}C(U)	16,8 ± 0,3	6,07 ± 0,12	8,81 ± 0,17	3,31 ± 0,29	2,07 ± 0,05	0,63 ± 0,09
3-T-^{14}C(U)	4,5 ± 0,1	1,55 ± 0,04	1,57 ± 0,04	1,53 ± 0,07	0,34 ± 0,02	0,22 ± 0,03
4-T-^{14}C(U)	171,0 ± 7,0	56,0 ± 1,7	60,7 ± 2,0	51,3 ± 3,7	7,43 ± 0,14	0,14 ± 0,02
5-T-^{14}C(U)	6,6 ± 0,1	1,93 ± 0,04	2,03 ± 0,05	1,83 ± 0,09	0,38 ± 0,02	0,21 ± 0,02
6-T-^{14}C(U)	15,4 ± 0,3	7,59 ± 0,15	8,08 ± 0,16	7,10 ± 0,30	6,01 ± 0,12	0,85 ± 0,07

Tabelle 14. $T/^{14}C$-Einbauraten in Saccharose, Glucose(S), Fructose(S) und Hamamelose in Blättern von Primula clusiana nach Fütterung von positions-T- und uniform-^{14}C-markierten Glucosen im Licht.

Um die T-Einbauraten der Hamamelose auf die der Vergleichssubstanz Fructose(S) zu beziehen, wurde das Verhältnis $T/^{14}C_{Hamamelose}$: $T/^{14}C_{Fructose}$ berechnet und ebenfalls in Tab. 14 wiedergegeben. Der daraus abzuleitende im Zusammenhang mit der Hamamelose-Biosynthese auftretende T-Verlust gibt aber aus den im Folgenden dargelegten Gründen nur zum Teil die bei der Hamamelosesynthese selbst auftretende spezifische T-Elimination an :

Fructose(S) und Hamamelose haben zwar F-6-P als gemeinsamen Vorläufer, doch ist der Weg von diesem zur Fructose(S) kürzer als der zur Hamamelose, da Saccharose-Phosphat direkt aus F-6-P und UDPG (44,45), Hamamelose aber wahrscheinlich über FDP synthetisiert wird: Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Hinweise, die für eine Synthese von HDP aus einem Zuckerdiphosphat sprechen (vgl. 3.1.), werden durch einen Befund von Beck* ergänzt, der HDP-^{14}C nach Inkubation isolierter Spinatchloroplasten mit FDP-^{14}C erhielt.

FDP steht aber über Aldolase und TIM im Gleichgewicht mit GAP und DHAP. Da beide Enzymreaktionen zu T-Verlusten am FDP führen (48,49), muß das $T/^{14}C$-Verhältnis von FDP nach Applikation von Glucose-3-T-^{14}C(U), -4-T-^{14}C(U) und -5-T-^{14}C(U) auf alle Fälle kleiner sein als das von F-6-P. Natürlich können diese Nebenreaktionen auch bei der Saccharosesynthese zu T-Verlusten führen, da mit einer reversiblen Umwandlung des F-6-P zu FDP (und weiter zu den Triosephosphaten) gerechnet werden muß.

Diese Möglichkeit gewinnt zusammen mit der neueren Vorstellung über die zum größten Teil im Chloroplasten lokalisierte Saccharosesynthese durch die Befunde von Bassham et al.(50) an Gewicht: Die Autoren zeigten nämlich an isolierten Chloroplasten, daß FDP, GAP und DHAP die Chloroplastenmembran rascher durchdringen als F-6-P. Demnach sollte bei Applikation radioaktiv markierter Glucose wenigstens ein Teil der im Chloroplasten gebildeten markierten Saccharose aus einem F-6-P synthetisiert werden, das als FDP bzw. als GAP und DHAP in den Chloroplasten transportiert wurde.

---

*Beck,E.: Persönliche Mitteilung

Daß ein durch die Aldolase- und TIM-Reaktionen verursachter C-Austausch tatsächlich auftritt, zeigten Beck et al.(6), die bei der Fütterung von Glucose-1-^{14}C, -2-^{14}C und -6-^{14}C an Primula clusiana in der Glucose(S) zwischen 16 und 27 % der Markierung in der jeweiligen Gegenposition fanden; ähnliche Ergebnisse hatten in analogen Versuchen Altermatt und Neish(51) mit Weizenpflanzen sowie Kandler und Gibbs (52) mit Chlorella erhalten.

Das zur Hamamelose umgesetzte markierte FDP muß, da nach Heber et al.(53) und Latzko* Phosphofructokinase in Chloroplasten nicht nachweisbar ist, ausschließlich aus einem cytoplasmatischen FDP-Pool stammen. Der Transport in den Chloroplasten kann dabei-wie bereits erwähnt-entweder direkt oder nach Aldolasespaltung über die Triosephosphate erfolgen. Da zudem die Aktivität von Aldolase und TIM in photosynthetisch aktiven Pflanzengeweben sehr hoch ist (53-55), können also bei der über FDP verlaufenden Hamamelosesynthese erhebliche Austauschraten erwartet werden, die auf jeden Fall höher sein sollten, als die bei der Saccharosesynthese gefundenen. Dies bestätigten ebenfalls Beck et al.(6), die nach Fütterung positions-^{14}C-markierter Glucosen an Primula clusiana in der Hamamelose eine wesentlich stärkere "Verschmierung" des Radiokohlenstoffs fanden als in der Glucose(S).

Bei der Betrachtung der auf die Fructose(S) bezogenen T/^{14}C-Verhältnisse müssen also neben T-Verlusten bei der Umsetzung von FDP zu Hamamelose (HDP) auch zusätzliche durch Aldolase und TIM verursachte T-Verluste am FDP berücksichtigt werden.

Die Einbauraten (Tab. 14) zeigen, daß der T-Einbau in die Hamamelose zwar stets kleiner ist, als der in die Fructose(S); jedoch wird aus sämtlichen T-markierten, C-ständigen Wasserstoffpositionen der Glucose Tritium in die Hamamelose eingebaut, wenn auch die $T/^{14}C_{HA}$: $T/^{14}C_{Fruct}$ - Werte bei den einzelnen Fütterungsexperimenten erwartungsgemäß recht unterschiedlich sind.

---

*Latzko,E.: Persönliche Mitteilung

Aus dem bisher Gesagten sind die stärksten T-Verluste wegen der Austauschreaktionen über Aldolase und TIM bei den Versuchen mit Glucose-3-T-^{14}C(U), -4-T-^{14}C(U) und -5-T-^{14}C(U) zu erwarten.

3.3. Die Tritium-Verteilung innerhalb des Hamamelose- und Glucosemoleküls

Um die T/^{14}C-Einbauraten besser erklären zu können und um weitere Hinweise auf den Biosynthesemechanismus der Hamamelose zu erhalten, war es notwendig, durch Bestimmung der intramolekularen T-Verteilung in der Hamamelose und der als Vergleichssubstanz gewählten Glucose(S) einen genaueren Einblick in das Schicksal der einzelnen T-markierten Wasserstoffe bei der Hamamelosesynthese zu erhalten.

Nachdem es im Rahmen dieser Arbeit erstmals gelang, natürlich vorkommende Hamamelose zu kristallisieren, konnte für den Abbau T- und ^{14}C-markierter Hamamelose ein neues Verfahren ausgearbeitet werden, bei dem kristalline Hamamelose zu kristallinem Kaliumhamamelonat oxidiert wird, das dann mit Perjodat zu Oxalsäure, Ameisensäure und Formaldehyd gespalten wird (vgl. Abb.4). Die intramolekulare T-Verteilung wurde, wie in Abschnitt 2.10.7. erläutert, aus den T/^{14}C-Werten der einzelnen Substanzen errechnet. Verfälschungen der Abbauergebnisse durch Tritium-Isotopeneffekte konnten durch geeignete Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 2.10.6.).

Für die Bestimmung der intramolekularen T-Verteilung in der Vergleichssubstanz (Fructose(S)) bot sich der Abbau über das Phenyl-osotriazol nach Simon und Steffens (41) und Simon et al. (39,40) an. Da bei diesem Verfahren jedoch der T-Gehalt an C-1 der Fructose nicht genau ermittelt werden kann, wurde die Glucose(S) abgebaut (vgl.Abschnitt 2.11.).

Ein Unterschied bezüglich der intramolekularen T-Verteilung zwischen der Glucose(S) und der Fructose(S) besteht nur auf Grund der nicht vollständigen Intramolekularität und des hohen Isotopeneffektes bei dem Wasserstoffübergang in der GPI-Reaktion (vgl. Abschnitt 3.2.); dies bedeutet, daß nach Verfütterung von Glucose-2-T-^{14}C(U) der Prozentsatz des T an C-1 der Fructose kleiner ist, als an C-1 + C-2 der Glucose.

Die Tabellen 15 und 16 enthalten die intramolekularen Tritium-Verteilungen in der Hamamelose und der Glucose(S) nach Fütterung der einzelnen positions-T- und uniform-^{14}C-markierten Glucosen. Bei der Berechnung der Teilaktivität in Prozent der Gesamtaktivität wurde nicht, wie zum Teil üblich, die Summe der Teilaktivitäten sondern die Radioaktivität der bis zur konstanten spezifischen Aktivität kristallisierten Hexose gleich 100 % gesetzt, um den Fehler des Einzelwertes durch die Berechnungsweise nicht unnötig zu erhöhen.

Die Werte in den Tabellen 15 und 16 zeigen, daß Schwerpunkte der Radioaktivitätsverteilung sowohl in der Glucose(S), als auch in der Hamamelose wiedergefunden werden. So findet sich die Hauptaktivität nach Fütterung von Glucose-1-T-^{14}C(U), -2-T-^{14}C(U) und -6-T-^{14}C(U) an C-2^{1}+ C-5 der Hamamelose. Nach Applikation von Glucose-3-T-^{14}C(U) liegt der Radioaktivitätsschwerpunkt an C-1 der Hamamelose und nach Fütterung von Glucose-4-T-^{14}C(U) und -5-T-^{14}C(U) an C-3 + C-4 der Hamamelose.

Markierte Positionen der appl. Glucosen	Teilaktivität von Tritium in % der Gesamtaktivität der Hamamelose an den Positionen			Aktivitäts-bilanz in Prozent
	C-1	C-2[1] + C-5	C-3+C-4	
1-T-^{14}C(U)	6,2 ± 3,9	88,7 ± 3,7	2,7 ± 0,2	97,6 ± 7,8
2-T-^{14}C(U)	0,0 (±) 4,1	92,1 ± 4,0	2,6 ± 0,2	94,7 ± 8,3
3-T-^{14}C(U)	67,6 ± 4,4	25,5 ± 2,4	23,5 ± 2,3*	116,6 ± 9,1
4-T-^{14}C(U)	2,6 (±) 4,0	3,6 ± 0,2	92,1 ± 4,0	98,3 ± 8,2
5-T-^{14}C(U)	0,0 (±) 8,2	38,7 ± 3,1	50,5 ± 3,8	89,2 ±15,1
6-T-^{14}C(U)	0,3 (±) 4,1	90,0 ± 3,8	2,1 ± 0,1	92,4 ± 8,0

Tabelle 15: Verteilung von Tritium in Hamamelose nach Fütterung von positions-T- und uniform-^{14}C-markierten Glucosen im Licht.

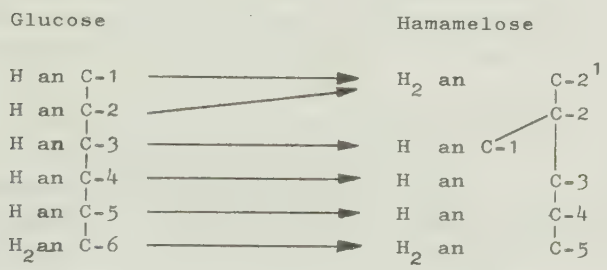
*Fehlergrenzen zu eng (siehe Text S.53)

Markierte Positionen der appl. Glucosen	Teilaktivität von Tritium in % der Gesamtaktivität der Glucose an den Positionen					Aktivitäts-bilanz in Prozent
	C-1	C-2	C-3	C-4+C-5	C-6	
1-T-^{14}C(U)	68,7 ± 2,8	1,9 (±) 4,0	5,5 ± 3,1	0,6 ± 0,05	25,6 ± 1,05	102,3 ±11,0
2-T-^{14}C(U)	1,5 ± 0,1	87,0 ± 0,6	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	11,6 ± 0,5	100,8 ± 1,5
3-T-^{14}C(U)	5,2 ± 0,4	3,3 ± 2,3	83,2 ± 4,2	0,7 ± 0,2	2,5 ± 0,2	94,9 ± 7,3
4-T-^{14}C(U)	0,1 (±) 0,2	0,0 (±) 6,4	0,2 ± 0,03	106,4 ±11,9	0,2 ± 0,02	106,9 ±18,55
5-T-^{14}C(U)	0,3 ± 0,2	0,5 (±) 4,6	1,2 ± 0,4	90,4* ± 3,9	6,4 ± 0,3	98,8 ± 9,4
6-T-^{14}C(U)	9,0 ± 0,4	12,3 ± 3,6	1,0 ± 0,5	0,8 ± 0,1	79,3 ± 3,3	102,4 ± 7,9

Tabelle 16: Verteilung von Tritium in Glucose aus der Saccharose nach Fütterung von positions-T- und uniform-^{14}C-markierten Glucosen im Licht.

*T an C-4 ≈ 0,6 %

Daraus ergeben sich folgende biogenetische Beziehungen zwischen den Wasserstoffatomen der Glucose und der Hamamelose:



Vergleicht man die T-Anteile zahlenmäßig, so zeigt sich in Analogie zu den von Beck et al.(6) mit ^{14}C gefundenen Ergebnissen eine stärkere Verschmierung des Tritiums in der Hamamelose als in der Glucose(S), was auf den erwähnten längeren Stoffwechselweg von dem gemeinsamen Vorläufer (F-6-P) zur Hamamelose hinweist.

Im Folgenden wird nun versucht, zusammen mit der Erläuterung der bei den einzelnen Fütterungen erhaltenen intramolekularen T-Verteilungen in der Hamamelose und der Glucose(S) diejenigen T-Verluste abzuschätzen, die spezifisch bei der Bildung von Hamamelose aus FDP auftreten.

Die T-Verteilung innerhalb des Glucose(S)-Moleküls nach der Fütterung von Glucose-1-T-^{14}C(U) zeigt einen T-Austausch von C-1 nach C-6, der durch die Reaktion von FDP mit Aldolase und TIM verursacht wird. Schwer verständlich ist das Auftreten von T-Aktivität an C-3 der Glucose(S) und damit an C-1 der Hamamelose. Dieser 1 ⇄ 3 Austausch der T-Markierung tritt in vergleichbarem Umfang auch bei den Fütterungsversuchen mit Glucose-3-T-^{14}C(U) und -6-T-^{14}C(U) auf. Dagegen liegt kein Anhaltspunkt für einen derartigen Austausch zwischen den Positionen 4 und 6 vor. Kandler und Gibbs (52) fanden nach Inkubation von Chlorella mit Glucose-1-^{14}C in der aus Stärke reisolierten Glucose u.a. auch einen Austausch von C-1 nach

C-3, der auf der Basis der Aldolasereaktion nur dann erklärbar ist, wenn ein Gleichgewicht von DHAP zu einer symmetrischen Triose - etwa zu freiem Dihydroxyaceton (DHA) oder Dihydroxyaceton-diphosphat (DHADP) - besteht (52). Auf diese Weise kann jedoch der Tritiumaustausch zwischen diesen Positionen aus den im Folgenden angeführten Gründen nicht gedeutet werden:

Die GPI überträgt den Wasserstoff von C-2 des G-6-P in die pro-R Position* des F-6-P (vgl. auch Abschnitt 3.2.), wobei der markierte Wasserstoff von G-6-P-1-T in dem entstehenden F-6-P-1-T in die pro-S Position gelangt (57). Bei der Aldolasereaktion wird dagegen der Wasserstoff aus der pro-S Position an C-1 des DHAP (= ehem. C-3 des FDP) entfernt (48,58). Die TIM schließlich greift wie auch die GPI an dem Wasserstoff in der pro-R Position an C-1 des Ketosephosphats an (49). Bei der Applikation von Glucose-1-T muß also mit folgender Reaktionssequenz gerechnet werden:

$$\text{Glucose-1-T} \xrightarrow{\text{HK}} \text{G-6-P-1-T} \xrightarrow{\text{GPI}} \text{F-6-P-1(S)-T} \xrightarrow{\text{PFK}} \text{FDP-1(S)-T}$$

$$\xrightarrow{\text{Aldolase}} \text{DHAP-3(S)-T} + \text{GAP} ;$$

Falls die Bildung einer symmetrischen Triose erfolgt, könnten folgende Reaktionen ablaufen:

$$\begin{array}{l} \text{DHAP-3(S)-T} \xrightleftharpoons{\text{TIM}} \text{GAP-3(S)-T} \\ \quad\downarrow \\ \text{DHADP-1(S),3(S)-T} \\ \text{(DHA - " ")} \\ \quad\downarrow \\ \text{DHAP-1(S),3(S)-T} \xrightleftharpoons{\text{TIM}} \text{GAP-1,3(S)-T} \end{array}$$

Die Aldolase-Kondensation von DHAP-1(S),3(S)-T mit GAP-3(S)-T würde zu FDP-1(S),6(S)-T führen, während DHAP-1(S),3(S)-T und GAP-1,3(S)-T ein FDP-1(S),4,6(S)-T ergäbe. Führt man die gleiche Betrachtung für den Versuch mit Glucose-2-T durch, so könnte der Austausch über symmetrische Triosen zu einer T-Aktivität an

---

*Nomenklatur nach Hansons' pro-R/pro-S System zur Bezeichnung identischer Liganden am tetraedrischen Kohlenstoffatom (56)

C-3 des FDP und damit auch der Glucose(S) führen. Da jedoch weder nach der Applikation von Glucose-1-T an der Position C-4, noch nach der Fütterung von Glucose-2-T an C-3 der Glucose(S) T-Aktivität gefunden wurde, kann die Möglichkeit eines Austausches über symmetrische Triosen mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Eine Erklärung des 1 ⟷ 3 T-Austauschs kann derzeit nicht gegeben werden.

Da T-Verluste nach Fütterung von Glucose-1-T auf der Ebene des FDP unwahrscheinlich sind, müßte der auf die Fructose(S) bezogene 48proz. T-Verlust (Tab. 14) in der Hamamelose nach Fütterung von Glucose-1-T-^{14}C(U) einem spezifischen Verlust bei der Hamamelosesynthese zugeschrieben werden.

Nach der Applikation von Glucose-2-T-^{14}C(U) zeigen die 11,6 % der T-Aktivität an C-6 der Glucose ebenso einen Austausch über FDP durch Aldolase und TIM wie nach Fütterung von Glucose-1-T-^{14}C(U). Wegen des hohen Isotopeneffektes und der nicht vollständigen Intramolekularität der GPI (siehe Abschnitt 3.2.) ist dieser Wert aber niedriger als die T-Aktivität an C-6 nach Fütterung von Glucose-1-T-^{14}C(U).

Der auf die Fructose(S) bezogene spezifische T-Verlust der Hamamelose von 37 % (Tab. 14) kann bei Berücksichtigung der Fehlergrenzen als angenähert gleich dem nach der Fütterung von Glucose-1-T-^{14}C(U) erhaltenen Wert betrachtet werden. Damit wäre ein T-Verlust bei beiden Wasserstoffen (pro-R und pro-S) an C-1 des FDP bei der Hamamelosesynthese zu fordern.

Nach der Fütterung von Glucose-3-T-^{14}C(U) treten an C-1 der reisolierten Glucose 5,2 %, an C-2 3,3 % und an C-6 2,5 % der T-Aktivität auf. Der Wasserstoffaustausch von C-3 nach C-1 und damit (über Aldolase und TIM) auch nach C-6, für den keine plausible Erklärung gegeben werden kann, wurde bereits besprochen (siehe S.50).

Der Wasserstoff an C-3 des FDP wird nach Aldolasespaltung durch TIM ausgetauscht. Simon et al.(59) geben für den einmaligen Wasserstoffübergang von DHAP ⟶ GAP eine Intramolekularität

von 9 % und einen Produktisotopeneffekt* von 6,2 an. Verschiedene Autoren zeigten, daß in photosynthetisch aktiven Geweben die Aktivität der TIM erheblich größer ist als die der Aldolase (53-55). Daher muß erwartet werden, daß der markierte Wasserstoff an C-3 des FDP-Anteils, der durch Aldolase gespalten und aus freien Triosephosphaten zu FDP wieder kondensiert wird, durch Austausch mit dem Medium verloren geht.

Aus dem Ergebnis des Fütterungsversuchs mit Glucose-2-^{14}C von Beck et al.(6) an Primula clusiana, der unter nahezu gleichen Bedingungen nur mit 30 statt 36 h Applikationszeit durchgeführt wurde, kann abgeschätzt werden, daß etwa 60 % des zu Hamamelose umgesetzten FDP aus den Triosephosphat-Pools stammen.** Der auf die Fructose(S) bezogene spezifische T-Verlust der Hamamelose von 78 % (Tab. 14) kann damit bis auf etwa 18 % (bzw. 45 %, bezogen auf die theoretische T-Aktivität des zur Hamamelose umgesetzten FDP) erklärt werden.

---

* Man versteht darunter das Verhältnis: Theoretische Wasserstoffisotopen-Fixierung (aus HTO) im Produkt ohne Isotopeneffekt zu experimentell gefundener Wasserstoffisotopen-Fixierung (59).

** Beck et al.(6) erhielten in diesem Versuch folgende ^{14}C-Verteilung in der Hamamelose (Angabe der Teilaktivitäten in Prozent der Gesamtaktivität der Hamamelose): C-1: 3,7 %, C-2: 40 %, C-3+C-4: 34 % und C-2'+C-5: 22 %. Wegen der biogenetischen Beziehungen zwischen C-2(C-5) des FDP und C-2(C-4) der Hamamelose (6) kann der Anteil des zu Hamamelose umgesetzten FDP, der aus dem Triosephosphat-Pool stammt, aus dem Verhältnis der Teilaktivitäten an C-2 und C-4 der Hamamelose berechnet werden. Dazu muß zunächst die ^{14}C-Aktivität an C-4 der Hamamelose abgeschätzt werden, da C-3 und C-4 gemeinsam bestimmt wurden. Da der Wert von 3,7 % an C-1 von den Autoren aus methodischen Gründen als möglicherweise zu niedrig angesehen wird, kann der Prozentsatz der allgemeinen "Verschmierung" der ^{14}C-Aktivität über die C-Atome der Hamamelose nur aus der Teilaktivität von

Bei der Tritiumverteilung innerhalb des Hamamelosemoleküls ist der relativ hohe Aktivitätsanteil von 25,5 % an C-2[1]+C-5 verglichen mit 11 % T an C-1+C-2+C-6 der Glucose(S) aus dem hohen spezifischen T-Verlust, der an der Position C-3 auftritt, verständlich. Der wegen der geringen Intramolekularität der TIM (59) unerwartet hohe Wert von 23,5 % der T-Aktivität an C-3+C-4 der Hamamelose weist einen wesentlich höheren Meßfehler auf, als in Tabelle 15 angegeben wird; da die T-Aktivität der gemessenen Ameisensäure sehr gering war, ist die Vernachlässigung des Fehlers, der durch den Nulleffektabzug entsteht (siehe 2.1.2.3.) in diesem Fall nicht zulässig.Der wahre Wert für die Teilaktivität an C-3+C-4 sollte deshalb wesentlich niedriger liegen.

Nach der Fütterung von Glucose-4-T-^{14}C(U) findet sich nahezu die gesamte T-Aktivität an den Positionen C-4+C-5 der Glucose(S) und entsprechend an C-3+C-4 der Hamamelose. Die auf die Fructose(S) bezogene Einbaurate von T in Hamamelose (Tab. 14) zeigt mit 86 % den stärksten T-Verlust von allen Versuchen. Jedoch ist bereits bei der Reaktion von FDP mit Aldolase und TIM ein T-Verlust an C-4 zu erwarten:

Nach Aldolasespaltung von FDP-4-T und TIM-Reaktion der Spaltprodukte liegen GAP-1-T und DHAP-1(S)-T in den Triosephosphat-Pools vor. (vgl. S. 51). Bei der Aldolasekondensation

---

22 % an C-2[1]+C-5 errechnet werden. Demnach ergibt sich für die Aktivität an C-4 nach Abzug von 11 % für C-3 eine Teilaktivität von 23 %. Da 40 % der ^{14}C-Aktivität an C-2 der Hamamelose gefunden wurden, stammen 23/40 oder 57,5 % aus dem Teil des zu Hamamelose umgesetzten FDP, der aus freien Triosephosphaten kondensiert wurde.

dieser Triosephosphate wird, wie bereits erwähnt (vgl.S. 50), der markierte Wasserstoff aus der pro-S Position an C-1 des DHAP stereospezifisch entfernt. Formal wäre also zunächst ein T-Verlust von 50 %* zu fordern. Bei der relativ hohen Aldolase-Aktivität in photosynthetisch aktiven Geweben (54,55) kann jedoch theoretisch auch ein vollständiger T-Verlust an C-4 des FDP über Aldolase und TIM postuliert werden. Da wie oben erläutert ca. 60 % des zu Hamamelose umgesetzten FDP auf dem Weg über Triosephosphate entstehen, können also maximal 60 % des aus den Einbauraten berechneten T-Verlustes auf diese Weise erklärt werden. Der restliche T-Verlust von mindestens 26 % bezogen auf die T-Aktivität der Fructose(S) bzw. mindestens 65 % bezogen auf die theoretische T-Aktivität des zu Hamamelose umgesetzten FDP muß der Hamamelosesynthese zugeschrieben werden.

Nach der Fütterung von Glucose-5-T-^{14}C(U) zeigt die intramolekulare Verteilung in der Glucose(S) eine zunächst schwer erklärbare Aktivität an C-6. Nach Simon** können jedoch beim Handelspräparat der 5-T-markierten Glucose 2-3 % der Aktivität an C-6 lokalisiert sein. Nachdem das T/^{14}C-Verhältnis der eingesetzten Glucose mehr wie dreimal so hoch war wie das der Glucose aus der Saccharose (Tab. 14), sollten den 6,4 % an C-6 der Glucose(S) bei einem spezifischen T-Verlust an C-5*** etwa 2 % an C-6 der eingesetzten Glucose entsprechen.

---

* Dieser T-Verlust ist aber wahrscheinlich geringer, da bei der Kondensation von GAP mit DHAP-1(S)-T ein primärer Isotopeneffekt zu erwarten ist. Simon et al. (59) haben nämlich bei der Aldolasespaltung von FDP in HTO für den T-Einbau in DHAP einen Produktisotopeneffekt (siehe Fußnote S.52) von 2,5 gemessen.

** Simon,H.: Persönliche Mitteilung

*** Ein spezifischer T-Verlust an C-5 der in Saccharose eingebauten Glucose ist durch Nebenreaktionen des Glucose-6-P-5-T über GPI, PFK, Aldolase und TIM zu erwarten.

Ein spezifischer T-Verlust an FDP ist nach dieser Fütterung in der gleichen Höhe wie nach der Applikation von Glucose-3-T-^{14}C(U) zu erwarten, da das bei der Aldolasespaltung von FDP-5-T entstandene GAP-2-T durch die TIM vollständig detritiert wird (vgl. S.51). Der aus den Einbauraten berechnete T-Verlust von 79 % (Tab. 14) kann wiederum zu 60 % (vgl. S.52) auf T-Verluste des FDP durch Aldolase und TIM zurückgeführt werden. Die restlichen 19 % bzw. 48 % bezogen auf die theoretische T-Aktivität des zu Hamamelose umgesetzten FDP sollten der Hamamelosesynthese zugeschrieben werden.

Bei Berücksichtigung des hohen durch Aldolase und TIM verursachten spezifischen T-Verlusts an C-5 des FDP ist auch die relativ hohe Teilaktivität von 38,7 % an C-2^1+C-5 der Hamamelose verständlich, da die 7,6 % der T-Aktivität an C-1+C-2+C-6 der Glucose(S) beim Vergleich mit den entsprechenden Positionen der Hamamelose (vgl. S.49) mit dem Faktor 5 multipliziert werden müssen.

Nach der Fütterung von Glucose-6-T-^{14}C(U) zeigt die T-Verteilung in der Glucose(S) wieder einen durch Aldolase, TIM und GPI verursachten T-Austausch von C-6 nach C-1 und C-2. In der Hamamelose findet sich dementsprechend fast die gesamte T-Aktivität an C-2^1+C-5.

Da durch die Aldolase- und TIM-Reaktionen T-Aktivität von C-6 des FDP* in die pro-R und pro-S Position an C-1 des FDP ausgetauscht wird, könnte der aus den Einbauraten berechnete geringe spezifische T-Verlust von 15 % (Tab. 14) die gleiche Ursache haben, wie der im Mittel etwa 44proz. Verlust nach der Fütterung von Glucose-1-T-^{14}C(U) und -2-T-^{14}C(U), der ja auf Verluste an den beiden T-Atomen an C-1 des FDP zurückgeführt wurde. Nachdem etwa 60 % des zur Hamamelose umgesetzten FDP dem Pool der Triosephosphate entstammen (siehe S.52), sollten ca. 30 %

---

* In der applizierten Glucose-6-T sind beide Wasserstoffpositionen an C-6 markiert.

der T-Aktivität von C-6 nach C-1 des FDP ausgetauscht werden. Bei einem etwa 44proz. T-Verlust aus den beiden Positionen an C-1 des FDP kann man demnach für die Hamamelose aus der Fütterung von Glucose-6-T-^{14}C(U) einen T-Verlust von ca. 13 % abschätzen. Dies ist bei Berücksichtigung der Fehlergrenzen in guter Übereinstimmung mit dem gefundenen Wert. Somit tritt an C-6 des zur Hamamelose umgesetzten FDP kein merklicher T-Verlust auf.

Aus den Ergebnissen der einzelnen Fütterungsversuche wurde nach Berücksichtigung der durch Aldolase und TIM verursachten Austauschreaktionen der T-Verlust abgeschätzt, der bei der Synthese von Hamamelose (-diphosphat) aus FDP an den einzelnen Kohlenstoffatomen auftritt. Er beträgt etwa 44 % an C-1, 45 % an C-3 und C-5 sowie mindestens 65 % an C-4; an C-6 findet sich kein derartiger T-Verlust.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, sicherzustellen, daß die Hamamelose tatsächlich durch intramolekulare Umlagerung (6) einer geradkettigen Hexose entsteht. Falls dies bestätigt werden kann, sollten Hinweise auf den Mechanismus der Umlagerung erbracht werden. Außerdem war zu prüfen, ob HDP und HMP Zwischenprodukte dieses Biosyntheseweges sind.

4.1. Kondensation freier Triosen oder Umlagerung einer geradkettigen Hexose bei der Hamamelose-Biosynthese?

Beck et al.(6) postulierten auf Grund der Ergebnisse bei den Fütterungsexperimenten mit Glucose-1-^{14}C, -2-^{14}C, -(3,4)-^{14}C und -6-^{14}C, daß Hamamelose durch intramolekulare Umlagerung aus einer unverzweigtkettigen Hexose nach einem der Streptose- und Apiosebiosynthese analogen Mechanismus entsteht. Die Möglichkeit der Hamamelose-Biosynthese durch Übertragung einer C-1-Einheit auf ein Pentoseskelett oder durch intramolekulare Acyloin-Kondensation nach der Hypothese von Shemyakin et al.(60) konnte von diesen Autoren mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Hypothese einer Aldolkondensation zweier Moleküle GAP (61) wurde auf Grund der intramolekularen ^{14}C-Verteilung in der Hamamelose nach Applikation von Glucose-2-^{14}C (3,7 % der Gesamtaktivität an C-1, 40 % an C-2, 34 % an C-3+C-4 und 22 % an C-2^{1}+C-5 der Hamamelose) abgelehnt (6). Das Ergebnis dieses Versuchs läßt jedoch wegen der relativ hohen Aktivität an C-3+C-4 der Hamamelose noch die Möglichkeit offen, daß ein Teil der Hamamelose auch auf dem Wege der Kondensation zweier Triosemoleküle entsteht. Allerdings kann dieser Befund, wie von Beck et al.(6) bereits erläutert, leichter durch einen ^{14}C-Austausch von C-2 nach C-5 der Glucose (und damit nach C-4 der Hamamelose) über HK, GPI, PFK, Aldolase und TIM erklärt werden, da auch im C-5 der Glucose(S) eine Teilaktivität von 21 % gefunden wurde.

Die intramolekulare T-Verteilung in der Hamamelose nach Applikation von Glucose-4-T-^{14}C(U) sollte eindeutig zeigen, ob Hamamelose ausschließlich durch intramolekulare Umlagerung einer Hexose oder auch durch Kondensation aus zwei Molekülen Triosephosphat entsteht. Im letzteren Fall würde Tritium auf folgendem Weg in die Hamamelose gelangen:

$$\text{Glucose-4-T} \xrightarrow{\text{HK}} \text{G-6-P-4-T} \xrightarrow{\text{GPI}} \text{F-6-P-4-T} \xrightarrow{\text{PFK}} \text{FDP-4-T} \longrightarrow$$

$$\xrightarrow{\text{Aldolase}} \text{DHAP} + \text{GAP-1-T} \; ;$$

$$2\ \text{GAP-1-T} \longrightarrow \text{HDP-1,3-T} \; ; \text{ (Hypothetische Kondensation)}$$

Der Abbau der entsprechenden Hamamelose aus diesem Versuch (Tab. 15) zeigt jedoch eine eindeutige Markierung an C-3+C-4 und keine signifikante Aktivität an C-1. Damit kann die Möglichkeit einer Aldolkondensation von zwei Molekülen GAP bei der Biosynthese der Hamamelose mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Befunde über den Einbau von Tritium aus sämtlichen Positionen der Glucose* in Hamamelose und die klaren biogenetischen Beziehungen, die sich nun zwischen den einzelnen Wasserstoffatomen der Glucose und der Hamamelose ableiten lassen, entsprechen vielmehr der von Beck et al.(6) postulierten intramolekularen Umlagerung einer Hexose. Sie bestätigen den Befund dieser Autoren, daß bei der Umlagerung das Kohlenstoffatom 3 der unverzweigtkettigen Hexose aus der Kohlenstoffkette ausschert und zum C-1 der Hamamelose wird.

---

* Der Wasserstoff an C-2 der Glucose wird, wie in Abschnitt 3.2. erläutert, über GPI in die pro-R Position an C-1 des F-6-P und damit des FDP übertragen und zusammen mit dem Wasserstoff aus der pro-S Position an C-1 des FDP in Hamamelose eingebaut (vgl. auch Abschnitt 4.2.)

4.2. Der Mechanismus der intramolekularen Umlagerung

4.2.1. FDP als Ausgangssubstanz der Umlagerung

Beck et al.(6) postulierten, daß Hamamelose aus einem Fructosephosphat entsteht. Diese Vorstellung konnte durch Bestimmung der T-Einbauraten in Hamamelose nach Applikation T-positions- und ^{14}C-uniform markierter Glucosen unterstützt werden. Der T-Einbau in die Positionen C-2^1+C-5 der Hamamelose nach Applikation von Glucose-2-T läßt sich nämlich zwanglos erklären, wenn man annimmt, daß der Wasserstoff von C-2 der Glucose durch GPI mit einer Intramolekularität von etwa 70-80 % (46) in die pro-R Position an C-1 der Fructose übertragen wird und dann zusammen mit dem von C-1 der Glucose stammenden Wasserstoff (pro-S Position) an das Kohlenstoffatom C-2^1 der Hamamelose gelangt.

Da bei den Photosyntheseversuchen in $^{14}CO_2$ kein Hinweis auf nukleotidaktivierte Zwischenstufen bei der Biosynthese der Hamamelose erhalten wurde, jedoch an Hand der erstellten ^{14}C-Markierungskinetiken die biogenetische Sequenz HDP ⟶ HMP ⟶ freie Hamamelose gezeigt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, daß der Biosyntheseweg über FDP zu HDP und weiter über HMP zu freier Hamamelose verläuft. Durch die Befunde von Beck (vgl. Abschnitt 3.2.), der die Synthese von HDP aus FDP in isolierten Spinatchloroplasten nachweisen konnte, wird diese Anschauung unterstützt. Deshalb wurden aus den Ergebnissen der Fütterungsexperimente mit T-positions- und ^{14}C-uniform markierten Glucosen diejenigen T-Verluste berechnet, die bei der Synthese von Hamamelose (-diphosphat) aus FDP auftreten (vgl. Abschnitt 3.3.).

Diese Werte zeigen, daß die einzelnen T-markierten Wasserstoffe mit Ausnahme von T an C-6 des FDP bei der Biosynthese der Hamamelose spezifische Aktivitätsverluste von etwa 44 bis mindestens 65 % aufweisen.

4.2.2. 5-Keto-FDP als Zwischenprodukt

Nach Befunden von Beck et al.(6) schert bei der Biosynthese der Hamamelose C-3 aus dem Kohlenstoffskelett der Fructose aus. Demnach muß bei der Umlagerung die Bindung zwischen C-3 und C-4 wieder geknüpft werden. Für die Biosynthese der Streptose (7) wie auch der Apiose (1,2) wurde postuliert, daß die Spaltung der C-C-Bindung unter dem elektrophilen Einfluß zweier in β-Stellung befindlicher Carbonylgruppen vonstatten geht; in Analogie dazu könnte bei der Biosynthese der Hamamelose eine 5-Keto-Fructose die Ausgangsverbindung für die Umlagerung darstellen (6).

Da aber FDP, wie oben erläutert, wahrscheinlich der unmittelbare Vorläufer der Hamamelose ist, sollte das Zwischenprodukt 5-Keto-FDP sein. Diese Verbindung ist bezüglich der C-3-Hälften völlig symmetrisch gebaut. Das freie Vorliegen von 5-Keto-FDP müßte, da sich die Positionen C-3 und C-4 bzw. C-1 und C-6 nicht unterscheiden, zu einem scheinbaren T-Austausch zwischen diesen Positionen führen. Demnach sollten in diesem Fall nach der Applikation von Glucose-4-T auf folgendem Weg gleiche T-Aktivitäten von C-4 des FDP an C-1 und C-3 der Hamamelose gelangen:

FDP-4-T $\longrightarrow$ 5-Keto-FDP-4-T (identisch mit 5-Keto-FDP-3-T)
5-Keto-FDP-3,4-T $\longrightarrow$ Hamamelose-1,3-T (vgl. Abschnitt 3.3.)

Da die entsprechende Hamamelose jedoch nahezu ausschließlich an den Positionen C-3+C-4 T-markiert ist, kann im Verlauf der Hamamelose-Biosynthese kein freies 5-Keto-FDP vorkommen. Vielmehr sollte, falls die Umlagerung von dieser Verbindung ausgeht, die Oxidation des FDP und die Umlagerung am gleichen Enzymkomplex stattfinden, ohne daß 5-Keto-FDP zwischenzeitlich abdissoziieren kann.

Auch die bisher vergebliche Suche nach freier 5-Keto-Fructose bzw. freiem 5-Keto-FDP scheint diese Vorstellung zu bestätigen. Allerdings kann dieser Befund auch durch einen sehr kleinen und

dadurch schwer nachweisbaren Pool bedingt sein.

Experimentelle Hinweise auf die tatsächliche Existenz eines (enzymgebundenen) 5-Keto-FDP liefern die spezifischen T-Verluste an C-3, C-4 und C-5 des zu Hamamelose umgelagerten FDP:

Da der markierte Wasserstoff an C-5 des FDP bei der Umlagerung nicht vollständig verloren geht, sollte er in Analogie zur Xylose- und Apiose-Biosynthese* auf enzymgebundenes NAD übertragen und zur Reduktion des Umlagerungsproduktes wieder verwendet werden. Der gefundene 50proz. T-Verlust an C-5 deutet auf einen bei der Oxidation von FDP-5-T zu erwartenden primären Isotopeneffekt hin.

4.2.3. Spaltung des 5-Keto-FDP

Da die Bindung zwischen den Kohlenstoffatomen 3 und 4 eines freien oder symmetrisch gebundenen 5-Keto-FDP zwar labilisiert aber völlig unpolar wäre, und da eine homolytische Spaltung dieser Verbindung sehr unwahrscheinlich ist, müßte eine der beiden Ketogruppen an eine elektrophile Gruppe des Enzyms gebunden werden, um die für die Spaltung erforderliche Polarisierung der C_3-C_4-Bindung herbeizuführen. Theoretische Erwägungen geben einer Bindung der C-5-Carbonylgruppe an das Enzym eindeutig den Vorzug, da in diesem Falle der nach der Spaltung ausscherende Kohlenstoff (C-3) bereits zur Aldehydstufe oxidiert ist, und ein nukleophiler Angriff des entstandenen C-4-Carbanions an C-2 direkt zu 4-Keto-HDP führen würde (vgl. Abb. 6). Der experimentell

---

* Bei der Xylose-Biosynthese kehrt der Wasserstoff mit einer Intramolekularität von 100 % an das gleiche C-Atom, von dem er bei der Oxidation der UDP-Glucuronsäure an C-4 entfernt wurde, zurück (62). Dabei wird er wahrscheinlich intermediär auf enzymgebundenes NAD übertragen (62). Bei der Apiose-Biosynthese wechselt der Wasserstoff von C-4 der UDP-Glucuronsäure nach C-3^1 der Apiose (1), wobei ebenfalls ein Wasserstofftransfer über enzymgebundenes NAD angenommen wird (1).

ermittelte hohe Verlust von mindestens 65 % an C-4 des FDP unterstützt diese Überlegungen; denn durch den verstärkt elektrophilen Einfluß der aktivierten Carbonylgruppe wird nicht nur die Spaltung der C-C-Bindung ermöglicht, sondern auch eine Tautomerisierung des 5-Keto-FDP zu einem 4,5-Endiol ((I) in Abb.6) erleichtert, wobei der Wasserstoff (T) an C-4 verloren gehen muß.

Eine analoge Enolisierung der C-2-Carbonylgruppe sollte durch die erwähnte Polarisierung des 5-Keto-FDP-Moleküls relativ erschwert sein. Jedoch deutet der etwa 45proz. T-Verlust an C-3 des FDP daraufhin, daß ein T-Austausch an dieser Position durch die Ausbildung einer konjugierten Doppelbindung, die bei einer zusätzlichen Enolisierung des 4,5-Endiols ((I) und (II) in Abb.6) erfolgen kann, doch eintritt, wenn auch nicht im gleichen Umfang wie an C-4.

Ein bekanntes Beispiel für die postulierten enzymkatalysierten T-Austauschreaktionen in α-Stellung zu einer Carbonylgruppe durch eine Ketol-Endiol-Tautomerie liefern die Versuche von Hurwitz et al.(63), die bei Inkubation von RuDP mit Carboxydismutase in HTO einen T-Einbau an C-3 der Pentose nachweisen konnten.

Der T-Austausch an C-1 des FDP, der bei der Umlagerung zur Hamamelose in etwa gleichem Umfang an der pro-R wie auch der pro-S Position auftritt, deutet auf ein durch nicht enzymatische Enolisierung spontan entstehendes Intermediärprodukt hin. Dieser Befund zeigt, daß die C_3-C_4-Bindung tatsächlich unter dem verstärkt elektrophilen Einfluß der enzymgebundenen C-5-Carbonylgruppe gespalten werden muß, da hierbei aus C-4, C-5 und C-6 ein (durch Bindung an das Enzym stabilisiertes) DHAP-Carbanion ((III) in Abb. 6) und aus C-1, C-2 und C-3 primär 2-Keto-GAP ((IV) in Abb. 6) entsteht, das spontan in die stabilere Endiolform ((V) in Abb. 6), den Phosphatester eines Triose-Reduktons, übergehen sollte. Dabei können beide Wasserstoffe an C-3 (= C-1 des FDP) in gleicher Weise ausgetauscht werden*. Bei der Spaltung

---

* An C-1 des FDP wurde ein mittlerer T-Verlust von nur 44 %

eines an C-2 enzymgebundenen 5-Keto-FDP müßte man dagegen einen T-Verlust an C-6 des FDP erwarten, da in diesem Falle das 2-Keto-GAP aus C-4, C-5 und C-6 entstehen würde. Dies kann jedoch auf Grund der eindeutigen Ergebnisse (kein T-Verlust an C-6 des FDP) mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Das bei der Umlagerung intermediär entstehende 2-Keto-GAP muß (wahrscheinlich mit der Phosphatgruppe) an das Enzym gebunden sein, da ein Austausch mit nicht markierter Substanz* ausgeschlossen werden kann**. Dementsprechend wäre dann für das 5-Keto-FDP eine Enzymbindung außer an der C-5-Carbonylgruppe noch an der Phosphatestergruppe an C-1 zu fordern.

---

gefunden, während man bei der Enolisierung des 2-Keto-GAP zunächst 50 % erwarten würde. Jedoch könnte durch einen primären Isotopeneffekt der Wasserstoff aus der jeweils nicht markierten Position bevorzugt ausgetauscht werden.

* Ein Pool mit nicht markiertem 2-Keto-GAP bzw. dem entsprechenden Triose-Reduktonphosphat wäre, falls diese Verbindung im Verlauf der Umlagerung vom Enzym abdissoziieren kann, durchaus vorstellbar, da die zweite Spalthälfte, das DHAP-Carbanion nach Absättigung durch ein Proton in die Triosephosphat-Pools gelangt.

** Der Befund von Beck et al.(6), daß sämtliche Kohlenstoffatome der Glucose in die Hamamelose eingebaut werden, konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, da bei der Applikation ^{14}C-uniform markierter Glucose stets uniform markierte Hamamelose erhalten wurde: Bei den Abbauten der Hamamelose aus den einzelnen Fütterungsexperimenten mit T-positions- und ^{14}C-uniform-markierter Glucose wurde neben der Bestimmung der T/^{14}C-Werte stets zur Kontrolle die spezifische ^{14}C-Aktivität der Abbauprodukte bestimmt.

4.2.4. Kondensation der enzymgebundenen Spalthälften zu 4-Keto-HDP, Reduktion zu HDP und Dephosphorylierung zu freier Hamamelose

Die neue Bindungsbildung zwischen den Spalthälften kann durch nukleophilen Angriff des DHAP-Carbanions an C-2 des 2-Keto-GAP bzw. des Triose-Reduktonphosphats erfolgen. Das dabei entstehende 4-Keto-Hamamelose-2^1,5-Diphosphat müßte anschließend mit dem aus der Oxidation an C-5 stammenden enzymgebundenen Wasserstoff zu Hamamelose-2^1,5-Diphosphat* reduziert werden.

Bei der diskutierten Umlagerung müssen die Ausbildung der neuen C-C-Bindung und die anschließende Reduktion des 4-Keto-HDP stereospezifisch verlaufen, da andernfalls mehrere Isomere der Hamamelose in Primula clusiana vorkommen müßten, wofür jedoch keinerlei Anhaltspunkte vorliegen.

Das bei der Reduktion entstehende HDP wird dann, wie an Hand der ^{14}C-Markierungskinetiken von HDP, HMP und freier Hamamelose bei Photosynthese in $^{14}CO_2$ gezeigt, stufenweise zu freier Hamamelose dephosphoryliert.

In Abb. 6 ist ein Reaktionsschema für die Biosynthese der Hamamelose aus FDP dargestellt, in dem alle bisher vorliegenden Befunde vereinigt sind.

Der vorgeschlagene Reaktionsablauf läßt sich auch, wie bereits früher von Beck et al.(6) diskutiert, nach Art einer Aldolasereaktion (48,49,58,64,65) formulieren. Dabei könnte die Bindung an das Enzym entweder wie bei den Class I - Aldolasen (66) durch eine Schiff'sche Base (67-71) an C-5 des 5-Keto-FDP erfolgen oder man nimmt in Analogie zu den Verhältnissen bei den Class II Aldolasen (66,72,73) eine Bindung des Enzyms über ein bivalentes

---

* Die Strukturaufklärung des bisher beschriebenen HDP (vgl. Abschnitt 3.1. und Beck et al.(10)) steht noch aus. Jedoch kann nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erwartet werden, daß es sich um ein -2^1,5-Diphosphat handelt.

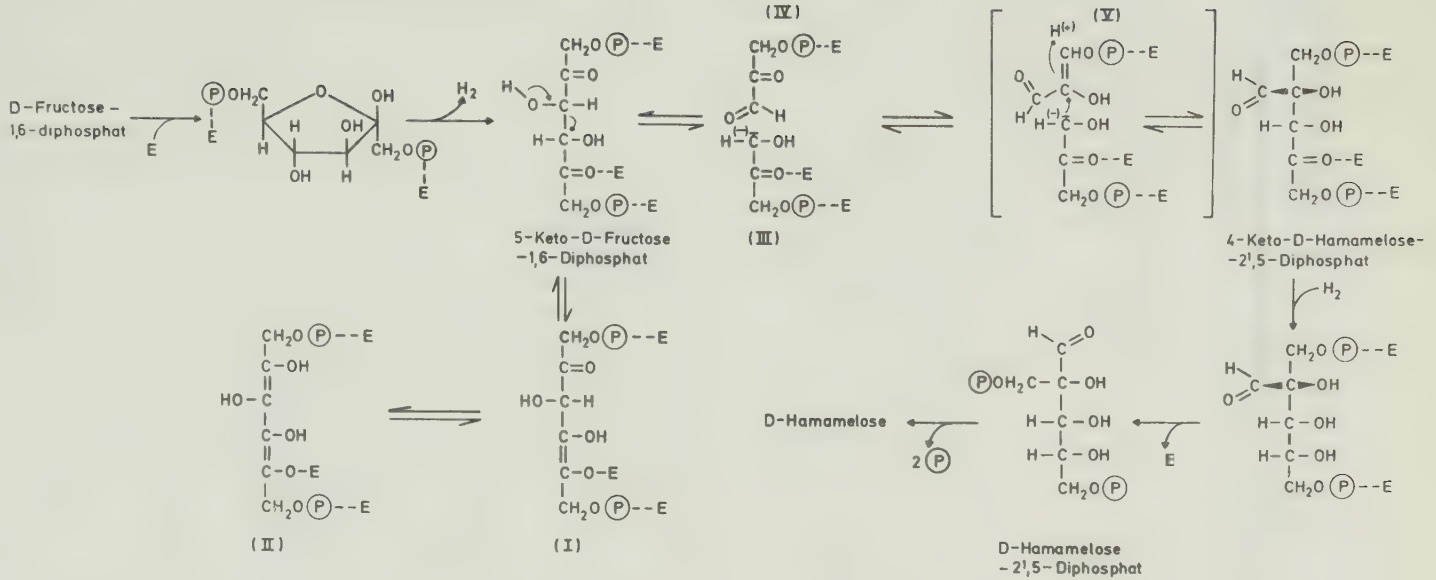


Abb.6: Hypothetischer Biosyntheseweg der Hamamelose.

E--- = Bindungsstelle an das Enzym

Metallkation an den Sauerstoff der Carbonylgruppe an. Da die Umlagerung an einem Diphosphat stattfindet, wäre es naheliegend, daß in Analogie zu dem FDP-Aldolase-Komplex (74) beide Phosphatgruppen an das Enzym gebunden sind.

5. Zusammenfassung

Der Mechanismus der Hamamelose-Biosynthese wurde in - vivo mit Blättern von Primula clusiana Tausch untersucht.

I. Nach Photosynthese in $^{14}CO_2$ gelang es HDP*, HMP und freie Hamamelose nebeneinander im Blattextrakt nachzuweisen. Die Kinetik der Markierung während 10 min Photosynthese zeigt eindeutig, daß die Sequenz der Biogenese HDP ⟶ HMP ⟶ freie Hamamelose sein muß.

II. Da Hamamelose in Primula clusiana nach Beck et al.(6) wie auch nach den vorliegenden Untersuchungen durch intramolekulare Umlagerung aus einem unverzweigtkettigen Hexosephosphat (wahrscheinlich aus einem Fructosephosphat) entsteht, muß nun angenommen werden, daß die intramolekulare Umlagerung von FDP zu HDP führt. HDP wurde außerdem von Beck et al.(10) auch in Spinat-Chloroplasten nach Photosynthese in $^{14}CO_2$ nachgewiesen.

Um Aufschlüsse über den Umlagerungsmechanismus zu erhalten, sollte nach Applikation von T-positions- und ^{14}C-uniformmarkierten Glucosen an Primelblätter der auf ^{14}C bezogene Einbau von Tritium aus den einzelnen Positionen der Glucose sowie die intramolekulare T-Verteilung sowohl in der Hamamelose als auch im FDP bestimmt werden. Da aber bei der Applikation von radioaktiver Glucose der Isotopengehalt von FDP in den Blättern äußerst gering ist, konnte der T-Einbau und die intramolekulare T-Verteilung in dieser Verbindung nicht direkt gemessen werden. Es wurde deshalb auf den stark markierten Fructoseanteil des Saccharose (Fructose(S)) zurückgegriffen. Da dieser über F-6-P in die Saccharose eingebaut wird und damit aus dem Pool der endogenen Fructosephosphate stammt, sollte seine Markierung einen Rückschluß auf den T-Gehalt des FDP erlauben.

---

* Abkürzungen siehe S. III

Die T/^{14}C-Einbaurate der Fructose(S) wurde aus der Differenz der T/^{14}C-Werte der Saccharose und der Glucose(S) bestimmt, die jeweils mit nicht radioaktiver Trägersubstanz bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität kristallisiert wurden.

Die Bestimmung der T/^{14}C-Einbaurate in die Hamamelose konnte an diesem Zucker direkt vorgenommen werden, da es erstmals gelang, natürlich vorkommende Hamamelose zu kristallisieren.

Zur Ermittlung der intramolekularen T-Verteilung in der Hamamelose wurde ein neues Abbauverfahren ausgearbeitet, bei dem kristalline Hamamelose mit Hypojodit zu (kristallinem) Kaliumhamamelonat oxidiert wird, das dann mit Perjodat in Oxalsäure, Ameisensäure und Formaldehyd gespalten wird (Abb.4). Verfälschungen der Abbauergebnisse durch Tritium-Isotopeneffekte konnten durch geeignete Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen ausgeschlossen werden.

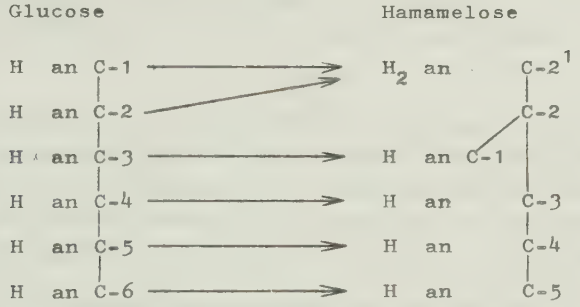
Zur Bestimmung der intramolekularen T-Verteilung in der Fructose(S) konnte diese nicht selbst abgebaut werden, da beim chemischen Abbau über das Phenyl-osazon der T-Gehalt am Kohlenstoffatom 1 nicht genau ermittelt werden kann (40). Es wurde deshalb die Glucose(S) über das Phenyl-osotriazol nach Modifikation des Verfahrens von Simon et al.(39-41) abgebaut. Zur Abschätzung der intramolekularen T-Verteilung in der Fructose-(S) muß lediglich der durch GPI verursachte T-Transport von C-2 nach C-1 berücksichtigt werden.

Weitere T-Verluste, die in Zusammenhang mit der Umwandlung des F-6-P zu FDP und dessen Gleichgewicht mit den Triosephosphaten stehen, konnten abgeschätzt werden. Damit ergab sich ein Bild der intramolekularen T-Verteilung im FDP.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen erlauben folgende Aussagen:

1. Alle C-ständigen Wasserstoffe der Glucose (und damit auch der Fructose) werden in die Hamamelose eingebaut. Dabei ergeben sich die folgenden biogenetischen Beziehungen zwischen den

Wasserstoffatomen der applizierten Glucose und denen der Hamamelose:



2. Der frühere Befund von Beck et al.(6), daß die Hamamelose durch intramolekulare Umlagerung und nicht etwa durch Kondensation zweier Moleküle Triosephosphat entsteht, konnte bestätigt werden, da nach der Applikation von Glucose-4-T eine Hamamelose vorlag, die nahezu ausschließlich an C-3 + C-4 und nicht zu gleichen Teilen an C-3 + C-4 und C-1 T-markiert war.

3. Die Berechnung der T-Verluste, die bei der Umwandlung von FDP zu HDP auftreten, ergab folgende Werte:
An C-1: 44 %; an C-3: 45 %; an C-4: mindestens 65 %; an C-5: 50 %; an C-6: 0 %.
Mit diesen Befunden konnten nun Aussagen über den Umlagerungsmechanismus gemacht werden:

a. Die intramolekulare T-Verteilung in der Hamamelose nach Applikation von Glucose-4-T sowie der 50proz. T-Verlust an C-5 zeigen, daß FDP zu enzymgebundenem 5-Keto-FDP oxidiert wird, wobei der Wasserstoff vermutlich auf einen enzymgebundenen Cofaktor übertragen und dann wieder zur Reduktion des Umlagerungsproduktes verwendet wird.

b. Die T-Verluste an C-3 und C-4 sprechen für eine Bindung des 5-Keto-FDP über die C-5-Carbonylgruppe an das Enzym. Unter dem somit verstärkt elektrophilen Einfluß der aktivierten Carbonylgruppe wird nicht nur die Spaltung der C_3-C_4-Bindung

ermöglicht, sondern auch eine Tautomerisierung des 5-Keto-FDP zu einem 4,5-Endiol begünstigt. In geringerem Umfang findet dabei auch eine durch die Ausbildung einer konjugierten Doppelbindung erleichterte Enolisierung der C-2-Carbonylgruppe statt.

c. Die Spaltung des 5-Keto-FDP führt, wie die T-Verluste in der pro-R und pro-S Position an C-1 des FDP zeigen, zu einem durch die Enzymbindung stabilisierten DHAP-Carbanion und zu 2-Keto-GAP, das spontan in die stabilere Endiolform, den Phosphatester eines Triose-Reduktons übergeht.

d. Die Kondensation der beiden enzymgebundenen Spalthälften führt zu 4-Keto-HDP; dieses wird zu HDP reduziert und schrittweise zu HMP und freier Hamamelose dephosphoryliert.

Alle bisher vorliegenden Befunde über die Biosynthese der Hamamelose aus FDP wurden in einem Reaktionsschema (Abb. 6) zusammengefaßt.

6. Literaturverzeichnis

(1) Grisebach,H., und U.Döbereiner: Z. Naturforschg. 21b, 429 (1966).

(2) Beck,E., und O.Kandler: Z. Pflanzenphysiol. 55, 71 (1966).

(3) Sandermann,H., und H.Grisebach: Biochim. Biophys. Acta 208, 173 (1970).

(4) Kindel,P.K., D.L.Gustine und R.R. Watson: Plant Physiol. 46, 27 (1970).

(5) Eickenbusch,J.D., J.Sellmair und E.Beck: Z. Pflanzenphysiol. 65, 24 (1971).

(6) Beck,E., J.Sellmair und O.Kandler: Z. Pflanzenphysiol. 58, 434 (1968).

(7) Candy,D.J., N.L.Blumson und J.Baddiley: Biochem. J. 91, 31 (1964).

(8) Sellmair,J.: Dissertation TU München 1968.

(9) Sellmair,J., und O.Kandler: Z. Pflanzenphysiol. 63, 65 (1970).

(10) Beck,E., H.Stransky und M.Fürbringer: FEBS Letters 13, 229 (1971).

(11) Rapkin,E.: Intertechnique: Digitechniques Febr. 1970, S.16.

(12) Haag,Ch., und W.Baumgartner: Beckman - LS - Applikationsbericht Nr.2, 1970, S.1ff.

(13) Kaczmarczyk,N., und J.Ruge: Int. J. Appl. Rad. and Isotopes 20, 653 (1969).

(14) Rapkin,E.: Intertechnique: Digitechniques Mai 1968, S.1ff.

(15) Denneler,A.: Z. Instr. 75, 131 (1967).

(16) Rauschenbach,P., und H.Simon: Z. Anal. Chem. 255, 337 (1971).

(17) Rauschenbach,P., und H.Simon: Z. Anal. Chem. 256, 119 (1971).

(18) Beckman Instruments INC. LS-233, LS-250 Liquid Scintilation Systems, Fullerton, California (USA) Dez. 1967, Section II.

(19) Herberg,R.J.: Anal. Chem. 35, 786 (1963).

(20) Bartsch,H.J.: "Mathematische Formeln" VEB Fachbuchverlag, Leipzig 1961.

(21) Sirk,H., und M.Draeger: "Mathematik für Naturwissenschaftler und Chemiker" Verlag Th.Steinkopff, Dresden und Leipzig 1963.

(22) Kalberer,F., und J.Rutschmann: Helv. Chim. Acta 44, 1956 (1961).

(23) van Scherpenberg,H., W.Gröbner und O.Kandler in: Festschrift Kurt Mothes 65. Geburtstag, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1965, S. 387ff.

(24) Trevelyan,W., D.D. Procter und J.S.Harrison: Nature (London) 166, 444 (1950).

(25) Frahn,J.L., und J.A.Mills: Chem. Ind. 1956, 578.

(26) Overend,W.G., und N.R.Williams: J. Chem. Soc. 1965, 3446.

(27) Lemieux,R.U. in: R.L.Whistler, M.L.Wolfrom, J.N.BeMiller und F.S.Shafizadeh: "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol.I, Academic Press, New York 1962, S. 45ff.

(28) Gilck,H.: Diplomarbeit TU München 1969.

(29) Moore,S., und K.P.Link: J. Biol. Chem. 133, 293 (1940).

(30) Freudenberg,K., und F.Blümel: Ann. Chem. 440. 45 (1924).

(31) Döbereiner,U.J.: Dissertation Universität Freiburg 1966.

(32) Weygand,F., H.Simon und K.D.Keil: Chem. Ber. 92, 1635 (1959).

(33) Isbell,H.S., H.l.Frush und N.B.Holt: Anal. Chem. 33, 225 (1961).

(34) Isbell,H.S., und L.T.Sniegoski: J. Res. NBS 67A (Phys. and Chem.), No.6, 569 (Nov. - Dez. 1963).

(35) Simon,H., und G.Heubach: Z. Naturforschg. 18b, 159 (1963).

(36) Simon,H., und G.Heubach: Z. Naturforschg. 18b. 160 (1963).

(37) Avigad,G.: Carbohyd. Res. 11, 119 (1969).

(38) Belcher,R., G.Dryhurst und A.M.G.McDonald: J. Chem. Soc. 1965, 4543.

(39) Simon,H., H.D.Dorrer und A.Trebst: Z. Naturforschg. 19b, 734 (1964).

(40) Simon,H., H.D.Dorrer und K.E.Ebert: Z. Naturforschg. 18b, 360 (1963).

(41) Simon,H., und J.Steffens: Chem. Ber. 95, 358 (1962).

(42) Beck,E.: Im Druck 1972.

(43) Bassham,J.A.: Science 172, 526 (1971).

(44) Bird,J.F., H.K.Porter und C.R.Stocking: Biochim. Biophys. Acta 100, 366 (1965)

(45) Delmer,D.P., und P.Albersheim: Plant Physiol. 45, 782 (1970).

(46) de Galdeano,L.A.G., und H.Simon: Z. Physiol. Chem. 351, 1113 (1970).

(47) Fedke,C.: Progr. Photosyn. Res. 3, 1597 (1969).

(48) Rose,I.A., und S.V.Rieder: J. Biol. Chem. 231, 315 (1958).

(49) Rieder,S.V., und I.A.Rose: J. Biol. Chem. 234, 1007 (1959).

(50) Bassham,J.A., M.Kirk und R.G.Jensen: Biochim. Biophys. Acta 153, 211 (1968).

(51) Altermatt,H.A., und A.C.Neish: Can. J. Biochem. Physiol. 34, 405 (1956).

(52) Kandler,O., und M.Gibbs: Z.Naturforschg. 14b, 8 (1959).

(53) Heber,U., U.W.Hallier und M.A.Hudson: Z. Naturforschg. 22b, 1200 (1967).

(54) Peterkofsky,A., und E.Racker: Plant Physiol. 36, 409 (1961).

(55) Gibbs,M., E.Latzko, R.G.Everson und W.Cockburn in: A.San Pietro, F.A.Greer und T.J.Army: "Harvesting the Sun - Photosynthesis in Plantlife" Academic Press, New York 1967, S.111ff.

(56) Hanson,K.R.: J. Am. Chem. Soc. 88, 2731 (1966).

(57) Rose,I.A., und E.L.O'Connell: Biochim. Biophys. Acta 42, 159 (1960).

(58) Rose,I.A.: J. Am. Chem. Soc. 80, 5835 (1958).

(59) Simon,H., R.Medina und G.Müllhofer: Z. Naturforschg. 23b, 59 (1968).

(60) Shemyakin,M.M., A.S.Khoklov und M.N.Kolosov: Dokl. Akad. Nauk Uz. SSR 85, 1301 (1952); ref. C. A. 47, 4292a (1953).

(61) Hough,L., und J.K.N.Jones: Adv. Carbohydr. Chem. 11, 213 (1956).

(62) Ankel,H., und D.S.Feingold: Biochemistry 4, 2468 (1965).

(63) Hurwitz,J., W.B.Jacoby und B.L.Horecker: Biochim. Biophys. Acta 22, 194 (1956).

(64) Rose,I.A., E.L.O'Connell und A.H.Mehler: J. Biol. Chem. 240, 1758 (1965).

(65) Rose,I.A., und E.L.O'Connell: J. Biol. Chem. 244, 126 (1969).

(66) Rutter,W.J.: Federation Proc. 23, 1248 (1964).

(67) Grazi,E., P.T.Rowley, T.Cheng O.Tchola und B.L.Horecker Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 38 (1962).

(68) Speck,J.C.jr., P.T.Rowley und B.L.Horecker: J. Am. Chem. Soc. 85, 1012 (1963).

(69) Cash,D.J., und I.B.Wilson: J. Biol. Chem. 241, 4290 (1966).

(70) Brand,K., und B.L.Horecker: Arch. Biochem. Biophys. 123, 312 (1968).

(71) Model,P., L.Ponticorvo und D.Rittenberg: Biochemistry 7, 1339 (1968).

(72) Kobes,R.D., R.T.Simpson, B.L.Vallee und W.J.Rutter: Biochemistry 8, 585 (1969).

(73) Mildvan,A.S., R.D.Kobes und W.J.Rutter: Biochemistry 10, 1191 (1971).

(74) Ginsburg,A., und A.H.Mehler: Biochemistry 8, 2623 (1966).

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Angewandte Botanik der Technischen Universität München und am Institut für Allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Beck angefertigt.

Ihm gilt mein besonderer Dank für Interesse, Anregung und Unterstützung, die er meiner Arbeit entgegen brachte.

Herrn Prof. Dr. O. Kandler danke ich für die finanzielle Unterstützung, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. H. Simon und Herrn Dr. K. Schmidt für anregende Diskussionen.

Lebenslauf

Am 22.6.1944 wurde ich, Hans Gilck, als Sohn des Gartengestalters Hans Gilck und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Heller, in Söcking geboren.

Von 1950 bis 1965 besuchte ich die Volksschule in Söcking und von 1954 bis zur Reifeprüfung im Jahre 1963 das Realgymnasium in Starnberg.

Im Wintersemester 1963/64 begann ich das Studium der Biologie an der Technischen Universität München, legte im März 1966 die Vorprüfung und am 12. Mai 1969 die Hauptprüfung für Diplombiologen ab. Anschließend begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Institut für Angewandte Botanik der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Beck. Seit dem Wintersemester 1969/70 führte ich diese Arbeit am Botanischen Institut der Universität München fort.